

Daniela Filipa Nunes de Almeida

## **ESTUDO DA LESÃO RENAL INDUZIDA POR HIPÓXIA**

### **Trabalho de Projeto**

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia



Outubro, 2018

Daniela Filipa Nunes de Almeida

## **ESTUDO DA LESÃO RENAL INDUZIDA POR HIPÓXIA**

### **Trabalho de Projeto**

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia

Trabalho efetuado sob orientação de

Helena Vala

Trabalho efetuado sob a co-orientação de

Sandra Ribeiro

Outubro, 2018



Orientadores

---

(Dr.<sup>a</sup> Helena Vala)

---

(Dr.<sup>a</sup> Sandra Ribeiro)

“As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do  
autor”



*“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança  
toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”*

*Johann Goethe*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de começar por agradecer à Dr<sup>a</sup>. Helena Vala, coordenadora do meu trabalho, que sempre se mostrou disponível, paciente e empenhada para que a sua realização fosse possível.

Gostaria também de agradecer à Dr<sup>a</sup> Sandra Ribeiro, coordenadora externa do meu trabalho, que sempre se mostrou dedicada no esclarecimento de dúvidas e que foi uma ajuda fundamental na obtenção dos animais em estudo.

Gostaria ainda de agradecer à Engenheira Carla Garcia pela sua ajuda fundamental na execução do processamento das amostras e pela sua simpatia.

Gostaria, como não poderia deixar de ser, de agradecer também a todos os outros professores que me fizeram crescer enquanto profissional através da transmissão de conhecimentos nas aulas do primeiro ano do mestrado.

Queria ainda agradecer à Cris e à Baraldi, por sempre me incentivarem a terminar o mestrado e por nunca me terem deixado desistir.

*“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante.”*  
(Paulo Coelho)

## **TÍTULO**

Estudo da lesão renal induzida por hipóxia

## **RESUMO**

A anemia é uma complicação quase universal nos pacientes em estágios avançados de doença renal crónica, sendo, na maioria das vezes, resultado da produção anormal de eritropoietina e da deficiência de ferro e comumente observada em indivíduos com insuficiência renal crónica.

A produção diminuída de eritropoietina reflete-se numa produção diminuída de eritrócitos que, quando excede a capacidade de reposição pela medula óssea, resulta numa menor capacidade de transporte de oxigénio para atender às necessidades teciduais (hipóxia). Em resposta à hipóxia, os rins sofrem alterações adaptativas, de modo a sobreviver às condições patológicas. O presente trabalho teve como objetivo esclarecer quais as lesões renais que surgem em situações de diferentes níveis de anemia e à hipóxia subsequente.

Do estudo histopatológico efetuado em 24 animais, com níveis crescentes de anemia, verificou-se que a congestão foi a primeira lesão a ser detetada, resultado da hipóxia provocada pela anestesia, seguida da reabsorção tubular e inflamação, e, por fim, das lesões glomerulares, especificamente, hipercelularidade.

## **Palavras-chave**

Anemia, hipoxia, eritropoietina, lesão renal

## **TITLE**

Study of renal research induced by hypoxia

## **ABSTRAT**

Anemia is an almost universal complication in patients in advanced stages of chronic kidney disease (Abensur, 2010), and is most often the result of abnormal production of erythropoietin and iron deficiency (Krikorian, 2008) and commonly observed in individuals with IRC (Chonchol *et al.*, 2008).

The deficient production of erythropoietin is reflected in a decreased production of erythrocytes, which when it exceeds bone marrow replacement capacity, results in a lower oxygen transport capacity to meet tissue needs (hypoxia) (Moreira, 2010).

In response to hypoxia, the kidneys undergo adaptive changes in order to survive pathological conditions (Liu *et al.*, 2017).

In order to clarify the renal lesions that arise in situations of hypoxia, the present study appeared, where it was verified that the greater the anemia that the animal suffers, the greater the number of lesions that presented and of greater degree.

## **KEYWORDS**

Anemia, hypoxia, erythropoietin, renal damage

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	VI
TÍTULO .....	VII
RESUMO.....	VII
Palavras-chave.....	VII
TITLE .....	VIII
ABSTRAT .....	VIII
KEYWORDS .....	VIII
ÍNDICE GERAL .....	IX
ÍNDICE DE QUADROS .....	XI
ÍNDICE DE IMAGENS.....	XII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XX
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1. Anemia .....	23
2.2. Hipóxia .....	28
2.2.1. Factores Induzíveis de Hipóxia (HIF) .....	29
2.3. Doença Renal Crónica .....	31
2.3.1. Inflamação.....	32
2.3.2. Lesões renais.....	37
3. COMPONENTE PRÁTICA.....	39
3.1. Material e Métodos .....	39
3.1.1. Critérios para obter a População.....	39
3.1.2. Caracterização da População .....	40
3.1.3. Avaliação Histopatológica das Lesões Renais.....	41
3.2. Resultados.....	51
3.2.1. Iconografia .....	61

3.4. Discussão .....	83
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Principais factores de crescimento celular e sua actividade principal, com destaque para a EPO .....	24
Quadro 2. Factores estimuladores e inibidores da eritropoiese .....	27
Quadro 3. Classificação da Doença Renal.....	31
Quadro 4. Grupos de Trabalho.....	41
Quadro 5. Lesões vasculares estudadas nos grupos de animais controlo.....	45
Quadro 6. Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anémicos.....	46
Quadro 7. Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais controlo.....	47
Quadro 8. Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anémicos. ....	48
Quadro 9. Lesões tubulares estudadas no grupo de animais controlo.....	49
Quadro 10. Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anémicos. ....	50

## ÍNDICE DE IMAGENS

Figura 1. Esquema resumo do papel da inflamação na diminuição da eritropoietina e da mobilização de ferro .....	35
Figura 2. Representação esquemática entre a EPO, o ferro e a hepcidina .....	36
Figura 3. Lesões vasculares estudadas nos grupos de animais controlo. ....	51
Figura 4. Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anémicos. ....	52
Figura 5. Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anémicos G3a. ....	52
Figura 6. Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anémicos G3b. ....	53
Figura 7. Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anémicos G3c. ....	53
Figura 8. Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais controlo. ....	54
Figura 9. Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anémicos. ....	55
Figura 10. Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anémicos G3a. ....	55
Figura 11. Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anémicos G3b. ....	56
Figura 12. Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anémicos G3c. ....	56
Figura 13. Lesões tubulares estudadas no grupo de animais controlo. ....	57
Figura 14. Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anémicos. ....	58
Figura 15. Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anémicos G3a. ....	59
Figura 16. Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anémicos G3b. ....	59
Figura 17. Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anémicos G3c. ....	60
Figura 18. Rato W28 (G1). Córtex renal normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 .....	61
Figura 19. Rato W14 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	61
Figura 20. Rato W21 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	61
Figura 21. Rato W28 (G1). Córtex renal normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1. ....	61
Figura 22. Rato W1 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 0 e hiperémia de grau 0 .....	61
Figura 23. Rato W25 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	61
Figura 24. Rato W3 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 .....	62



Figura 25. Rato W10 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	62
Figura 26. Rato W14 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	62
Figura 27. Rato W21 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 .....	62
Figura 28. Rato W22 (G1). Glomérulos normais, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	62
Figura 29. Rato W14 (G2). Medular normal, congestão de grau 0 .....	62
Figura 30. Rato W1 (G2). Medular normal, congestão de grau 1 .....	63
Figura 31. Rato W27 (G1). Medular normal, congestão de grau 2 .....	63
Figura 32. Rato W26 (G1). Pélvis normal .....	63
Figura 33. Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossidderínicos de grau 1 ...	63
Figura 34. Rato W28 (G1). Côrtex normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 .....	63
Figura 35. Rato W28 (G1). Côrtex normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 .....	63
Figura 36. Rato W1 (G2). Côrtex normal, congestão de grau 0 e hiperémia de grau 0 .....	64
Figura 37. Rato W1 (G2). Côrtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	64
Figura 38. Rato W3 (G2). Côrtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	64
Figura 39. Rato W10 (G2). Côrtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	64
Figura 40. Rato W14 (G2). Glomérulos normais, congestão de grau 1 .....	64
Figura 41. Rato W28 (G1). Glomérulos normais, congestão de grau 2 .....	64
Figura 42. Rato W14 (G2). Medular normal, congestão de grau 0 .....	65
Figura 43. Rato W1 (G2). Medular normal, congestão de grau 1 .....	65
Figura 44. Rato W22 (G1). Medular normal, congestão de grau 2 .....	65
Figura 45. Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossiderínicos de grau 1 .....	65
Figura 46. Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossiderínicos de grau 1 .....	65
Figura 47. Rato W28 (G1). Córtex normal, congestão de grau 2 .....	65
Figura 48. Rato W1 (G2). Córtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	66

Figura 49. Rato W1 (G2). Córtex normal, hiperémia de grau 0 .....	66
Figura 50. Rato W10 (G2). Córtex normal, congestão de grau 1 .....	66
Figura 51. Rato W10 (G2). Córtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 .....	66
Figura 52. Rato W14 (G2). Glomérulos normais, congestão de grau 1.....	66
Figura 53. Rato W14 (G2). Medular normal, congestão de grau 0.....	66
Figura 54. Rato W1 (G2). Medular normal, congestão de grau 1 .....	67
Figura 55. Rato W27 (G1). Medular normal, congestão de grau 2.....	67
Figura 56. Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossiderínicos de grau 1 .....	67
Figura 57. Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1 .....	67
Figura 58. Rato W8 (G3A). Região Intercorticomedular .....	67
Figura 59. Rato W16 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2.....	68
Figura 60. Rato W6 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1 .....	68
Figura 61. Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2 .....	68
Figura 62. Rato W8 (G3A) Papila normal.....	68
Figura 63. Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, reabsorção dos túbulos contornados proximais.....	68
Figura 64. Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 .....	68
Figura 65. Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	69
Figura 66. Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	69
Figura 67. Rato W6 (G3A). Glomérulo com infiltrado inflamatório e reabsorção dos túbulos contornados proximais.....	69
Figura 68. Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	69
Figura 69. Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2 .....	69
Figura 70. Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 .....	69
Figura 71. Rato W23 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1 .....	70
Figura 72. Rato W8 (G3A). Papila normal.....	70
Figura 73. Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, reabsorção dos túbulos contornados proximais.....	70

Figura 74. Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 .....	70
Figura 75. Rato W16 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2.....	70
Figura 76. Rato W23 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	70
Figura 77. Rato W6 (G3A). Glomérulo com infiltrado inflamatório de grau 1 e reabsorção dos túbulos contornados proximais .....	71
Figura 78. Rato W6 (G3A). Glomérulo e intertício com infiltrado inflamatório de grau 1 e reabsorção dos túbulos contornados proximais .....	71
Figura 79. Rato W6 (G3A). Intertício com infiltrado inflamatório de grau 1 e reabsorção dos túbulos contornados proximais .....	71
Figura 80. Rato W6 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1 e inflamação de grau 1 .....	71
Figura 81. Rato W8 (G3A). Reabsorção dos túbulos contornados proximais .....	71
Figura 82. Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2 .....	71
Figura 83. Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 .....	72
Figura 84. Rato W23 (G3A) Congestão de grau 1, inflamação de grau 1 e reabsorção de grau 3 .....	72
Figura 85. Rato W8 (G3A). Papila normal.....	72
Figura 86. Rato W2 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 e reabsorção de grau 3 .....	72
Figura 87. Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 e reabsorção de grau 3 .....	72
Figura 88. Rato W2 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	73
Figura 89. Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, infiltrado de grau 1 .....	73
Figura 90. Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3. ....	73
Figura 91. Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	73
Figura 92. Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	73

Figura 93. Rato W2 (G3B). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	73
Figura 94. Rato W2 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	74
Figura 95. Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	74
Figura 96. Rato W13 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3. ....	74
Figura 97. Rato W18 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	74
Figura 98. Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	74
Figura 99. Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	74
Figura 100. Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2 .....	75
Figura 101. Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2 .....	75
Figura 102. Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	75
Figura 103. Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	75
Figura 104. Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	75
Figura 105. Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	75
Figura 106. Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	76
Figura 107. Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	76
Figura 108. Rato W18 (G3B). Arteriola normal inflamação de grau 1 .....	76
Figura 109. Rato W18 (G3B). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	76

Figura 110. Rato W18 (G3B). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	76
Figura 111. Rato W2 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	76
Figura 112. Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	77
Figura 113. Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	77
Figura 114. Rato W13 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	77
Figura 115. Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3. ....	77
Figura 116. Rato W18 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1. ....	77
Figura 117. Pélvis normal, ductos colectores. ....	77
Figura 118. Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2, reabsorção de grau 3 .....	78
Figura 119. Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2 .....	78
Figura 120. Rato W7 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1 .....	78
Figura 121. Rato W20 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1.....	78
Figura 122. Rato W20 (G3C). Pélvis normal .....	78
Figura 123. Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1.....	78
Figura 124. Rato W4 (G3C). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3, gotas hialinas de grau 1 .....	79
Figura 125. Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	79
Figura 126. Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	79
Figura 127. Rato W12 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, reabsorção de grau 3 .....	79
Figura 128. Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	79

Figura 129. Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	79
Figura 130. Rato W20 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, glomérulo com hiper celularidade de grau 1 .....	80
Figura 131. Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 2, reabsorção de grau 3. ....	80
Figura 132. Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 2 .....	80
Figura 133. Rato W7 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1 .....	80
Figura 134. Rato W12 (G3C). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2 .....	80
Figura 135. Rato W20 (G3C). Pélvis normal .....	80
Figura 136. Rato W4 (G3C). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção d grau 3 e gotas hialinas de grau 1 .....	81
Figura 137. Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1.....	81
Figura 138. Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 .....	81
Figura 139. Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 .....	81
Figura 140. Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	81
Figura 141. Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2, reabsorção de grau 3. ....	81
Figura 142. Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3. ....	82
Figura 143. Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3. ....	82
Figura 144. Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, degenerescência hidrópica de grau 1, reabsorção de grau 3 .....	82
Figura 145. Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 2, reabsorção de grau 3 .....	82
Figura 146. Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 2, reabsorção de grau 3. ....	82

Figura 147. Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 .....	82
Figura 148. Rato W4 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 .....	83
Figura 149. Rato W7 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1 .....	83
Figura 150. Rato W20 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 .....	83
Figura 151. Rato W24 (G3C). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2 .....	83

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**AEE** – Agentes Estimuladores da Eritropoiese

**PCR** – Proteína C-Reativa

**DRC** – Doença Renal Crónica

**EMT** – Epithelial-mesenchymal Transition (Transição Epitélio-mesenquimal)

**EPO** – Eritropoietina

**ESRD** – End-stage Renal Disease (Doença Renal Terminal)

**FG** – Filtração Glomerular

**Hb** – Hemoglobina

**HIF** – Fator Induzido por Hipóxia

**IFN- $\gamma$**  – Interferão Gama

**IFTA** – Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular

**IRC** – Insuficiência Renal Crónica

**MBG** – Membrana Basal Glomerular

**PTC** – Capilar Peritubular

**rHuEPO** – Eritropoietina Recombinante Humana

**TNF- $\alpha$**  – Factor de Necrose Tumoral Alfa



## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crónica (IRC) é um problema de saúde mundial com incidência crescente (Ribeiro *et al.*, 2016d). Apresenta um carácter progressivo e está associada à elevada morbilidade e mortalidade (Vianna *et al.*, 2011), estando a perda da função renal associada à inflamação, ao comprometimento da disponibilidade de oxigénio e ao agravamento da anemia induzida por hipóxia, uma complicação comum em pacientes com IRC (Ribeiro *et al.*, 2016d).

São inúmeros os fatores que estão associados à instalação e progressão da IRC, tais como obesidade, hipertensão arterial e diabetes mellitus (Vianna *et al.*, 2011).

A hipóxia renal promove uma fibrose por estimulação das células renais para produzir matriz extracelular, contribuindo assim para a progressão da doença renal (Ribeiro *et al.*, 2016d).

Com o aumento das alterações renais, a probabilidade de surgir anemia aumenta, bem como a sua gravidade, sendo aceite que esta ocorrência se deve principalmente à redução da eritropoietina (EPO) produzida pelos rins afetados (Ribeiro *et al.*, 2016d).

A eritropoietina é a hormona chave para a regulação da eritropoiese, bem como para a sobrevivência e proliferação das células da medula óssea (Fernandes *et al.*, 2014).

A produção deficiente de EPO tem estado associada à doença renal crónica (DRC) e a doenças inflamatórias crónicas (Fernandes *et al.*, 2014).

Em animais com insuficiência renal crónica (IRC) a anemia é uma complicação que se desenvolve precocemente e cuja gravidade vai aumentando, à medida que a função renal diminui (Garrido *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016b).

A anemia surge principalmente devido a uma produção reduzida de EPO pelos rins, como já referido, no entanto, pode também estar relacionada com alterações no metabolismo de ferro (Ribeiro *et al.*, 2015), inflamação, diminuição da vida útil dos glóbulos vermelhos e toxinas ureicas (Ribeiro *et al.*, 2016b).

Em situações de IRC, com consequente diminuição de EPO, os rins sofrem alterações de modo a desenvolver mecanismos compensatórios para aumentar a sua produção, tendo sido realizados estudos que sugerem que, em resposta a uma baixa concentração de oxigénio, a produção de EPO renal é induzida (Garrido *et al.*,

2015). Esta produção é regulada pela hipóxia (deficiente oxigenação sanguínea), através do factor induzido por hipóxia (HIF) (Ribeiro *et al.*, 2016b).

Com o intuito de esclarecer quais as lesões renais oriundas de hipóxia e IRC, vários estudos têm sido realizados. Neste sentido, surgiu o projeto que a seguir se apresenta, em que, através de animais fornecidos pelo Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental (IBILI), da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, iremos avaliar histologicamente quais as lesões renais provocadas por hipóxia.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. ANEMIA**

A anemia constitui um dos problemas de saúde pública de maior magnitude no mundo, sendo definida como a diminuição da concentração de hemoglobina (Hb) no sangue (Moreira, 2010).

A sua etiologia é complexa e multifactorial (Chonchol *et al.*, 2008), ocorrendo, principalmente, devido à falha da produção de eritropoietina (uma glicoproteína principalmente produzida pelo rim e que é responsável pelo crescimento, diferenciação e redução da apoptose das células eritróides na medula óssea (Ribeiro *et al.*, 2016a)), por parte dos rins, para responder à diminuição da concentração de hemoglobina (McClellan *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2016a; Atkinson & Warady, 2017).

A concentração de Hb é determinada por alterações no volume total do plasma e da massa total de hemoglobina circulante, sendo a diminuição da hemoglobina, em geral, acompanhada por uma redução do hematócrito e da concentração dos eritrócitos (Moreira, 2010).

A anemia é uma complicação comum na doença renal crónica (Vlagopoulos *et al.*, 2005; Kovesdy *et al.*, 2006, Chonchol *et al.*, 2008) que surge precocemente (Abensur, 2010), estando associada ao início da decadência da função renal (Krikorian, 2008) e a um aumento da mortalidade em pacientes com insuficiência renal crónica (LANGSTON *et al.*, 2001), sendo que a sua prevalência aumenta à medida que ocorre diminuição da função renal (Vaziri, 2008; Abensur, 2010; Bastos *et al.*, 2010).

A etiologia da anemia na DRC é também multifatorial e caracteristicamente normocrómica, normocítica e com contagem de células vermelhas na medula óssea normal ou diminuída devido ao seu carácter hipoproliferativo, sendo a sua principal causa, a deficiência na produção de eritropoietina pelos fibroblastos peritubulares renais (Nangaku & Eckardt, 2006; Bastos *et al.*, 2010) devido à perda de massa renal (Bastos, 2006; Abensur, 2010). No entanto, a anemia é causada por uma variedade de mecanismos associados à DRC, incluindo a deficiência de EPO, como já referido, mas também, o comprometimento do metabolismo do ferro e a resistência aos agentes estimuladores da eritropoietina (AEE), no caso dos doentes tratados farmacologicamente com estes agentes para correcção da anemia (Silva,

1985; Post *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2016a; Gupta & Wish, 2017; Petrulienė *et al.*, 2017).

A anemia normocítica normocrômica pode ocorrer em várias doenças crônicas, e parece que a desregulação da homeostase do ferro e dos processos inflamatórios atuam como principais mediadores (Ezekowitz *et al.*, 2003; Weiss & Goodnough 2005; Wagner *et al.*, 2011), sendo a deficiência de ferro assim explicada pelo processo inflamatório implícito em pacientes com DRC, que apresentam níveis aumentados de hepcidina (Nemeth *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2016).

A produção renal de EPO, a hormona mais importante da regulação da hemoglobina, pode ser, prejudicada na DRC, resultando em baixos níveis ou deficiência absoluta desta hormona, causando diminuição dos níveis de hemoglobina (National Kidney Foundation, 2006). No entanto, uma vez que a anemia pode ser frequentemente observada, mesmo nos estágios iniciais da DRC, é improvável que o comprometimento leve a moderado da função renal seja o único mecanismo subjacente (Bosman *et al.*, 2001; Thomas 2006).

Evidências recentes sugerem que a anemia na DRC pode ser devido a uma sinalização hipóxica defeituosa, em vez de ser devido a uma incapacidade das células produtoras de eritropoietina para a sintetizar (Hung *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2015).

A EPO pertence a um vasto grupo de factores hematopoiéticos de crescimento que regulam a proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas da medula óssea, precursoras das células do sangue, nomeadamente, glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. Os factores de crescimento celular (Quadro 1) são genericamente divididos em dois subgrupos: citocinas e interleucinas. A eritropoietina pertence ao grupo das citocinas, responsáveis pela proliferação e maturação das células hematopoiéticas (Fontelonga, 2001).

**Quadro 1.** Principais factores de crescimento celular e sua actividade principal, com destaque para a EPO (Adaptado de King, 2018).

<b><u>FACTORES DE CRESCIMENTO</u></b>	<b><u>ACTIVIDADE PRINCIPAL</u></b>
EGF	Promove a proliferação de células mesenquimais e epiteliais.
<b>EPO</b>	<b>Promove a proliferação e diferenciação de eritrócitos.</b>
FGF	Promove a proliferação de muitas células; inibe algumas

	células-tronco;induz mesodermo a formar embriões precoce.
IGF-1	Promove a proliferação de muitos tipos de células.
IGF-2	Promove a proliferação de muitos tipos de células principalmente de origem fetal.
NGF	Promove a proliferação de neurites e a sobrevivência das células neurais.
PDGF	Promove a proliferação de tecido conjuntivo, células gliais e músculo liso.
TGF- $\alpha$	Importante para cicatrização normal de ferida, proliferação celular, maturação reprodutiva feminina, embriogénese.
TGF- $\beta$	Anti-inflamatório (suprime a produção de citocinas e a expressão de MHC de classe II), promove a cicatrização de feridas, inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos.

A EPO é a hormona chave na regulação da eritropoiese, que sustenta a proliferação, a sobrevivência e a diferenciação terminal de células progenitoras eritróides na medula óssea (Choi *et al.*, 1996; Moore & Bellomo, 2011; Fernandes *et al.*, 2014). Os eritroblastos sofrem um processo de multiplicação e diferenciação complexo na medula óssea, até atingirem o seu estado definitivo de maturação, altura em que entram na corrente sanguínea sob a forma de eritrócitos, células que transportam a hemoglobina (Fontelonga, 2001).

A redução na função de EPO afeta o estado proliferativo das células eritróides da medula óssea, que desencadearão várias mudanças no metabolismo do ferro, como nos níveis de ferro sérico, transferrina e ferritina, entre outros (Wish, 2006; Moulouel *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014).

A EPO é produzida principalmente no rim (sintetizada em células intersticiais semelhantes a fibroblastos aqui localizados (Koury *et al.*, 1988; Paliege *et al.*, 2010)) e, em menor quantidade, no fígado, circulando livremente no sangue (Fontelonga, 2001).

Por outro lado, a produção de eritrócitos também pode estar diminuída quando ocorre a sua destruição ou perda, e estas excedem a capacidade de reposição pela medula óssea, resultando numa menor capacidade de transporte de oxigénio para atender às necessidades teciduais (hipóxia) (Moreira, 2010).

A hipóxia, por sua vez, é o estímulo principal para a produção de EPO. A hipóxia, qualquer que seja a sua causa, é detetada por um sensor de oxigénio em certas células renais que, como resposta, aumentam a produção de EPO que, a nível da medula óssea, estimula a síntese e diferenciação de eritroblastos (Fontelonga, 2001).

Uma das principais causas de anemia é a redução da produção de eritropoietina em casos de insuficiência renal crónica (Moreira, 2010), sendo que, a nível fisiopatológico, a presença de anemia pode levar a consequências cardiovasculares adversas, bem como a doença renal crónica, tendo sido já observada uma interação significativa entre a anemia e a presença de DRC (Vlagopoulos *et al.*, 2005). A anemia e a DRC também mostraram ser fatores de risco para a morte em pacientes hospitalizados com insuficiência cardíaca congestiva e enfarte agudo do miocárdio (Kovesdy *et al.*, 2006). Podendo assim, ser afirmado que, a anemia aumenta o risco de doença cardiovascular (DCV) e de morte (Joss *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2011)

Dentro das ações da eritropoietina, está incluída a estimulação de células progenitoras eritroides e a diferenciação de normoblastos para aumentar a massa de glóbulos vermelhos, em resposta à ansiedade dos tecidos pré-estimulada pela anemia. Em resposta a estímulos hipóxicos, os rins sofrem alterações que conduzem a uma perda da produção de EPO, sendo que, na doença renal, a deficiência em EPO ocorre precocemente (Bosman *et al.*, 2001). A expressão da eritropoietina está, assim, inversamente relacionada com a oxigenação tecidular e com os níveis de hemoglobina (Weiss & Goodnough, 2005).

Por outras palavras, devido ao papel que a EPO desempenha na proliferação e diferenciação de progenitores eritroides e na regulação do fornecimento de oxigénio aos tecidos (Wu *et al.*, 1995), o rim adulto, como principal fonte de produção de EPO, é o órgão crítico para a regulação da eritropoiese. Portanto, para pacientes com DRC, com a progressão de lesão renal crónica e a perda de função renal, a anemia é uma complicação comum, predominantemente resultante da deficiência da produção renal de EPO (Fishbane & Nissenson, 2010; Koury & Haase, 2015).

A principal causa de anemia em pacientes com IRC está, assim, principalmente relacionada com uma deficiência na síntese de eritropoietina endógena pelo rim doente. No entanto, o papel da inflamação crónica no

desenvolvimento da anemia e na fraca resposta a estímulos (hiporesponsabilidade), por parte dos AEE, tem vindo a ganhar uma atenção crescente como potenciais fatores que podem afetar negativamente os resultados dos pacientes (Stenvinkel, 2001; Chonchol *et al.*, 2008).

A eritropoiese pode ser inibida por várias citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1, o factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferão gama (IFN- $\gamma$ ) (Quadro 2) (Stenvinkel, 2001; Weiss & Goodnough, 2005; Chonchol *et al.*, 2008). Além disso, altas concentrações plasmáticas da proteína C-reativa (PCR) demonstraram estar associados a anemia e hiporesponsabilidade dos AEE em alguns pacientes (Stenvinkel, 2001; Chonchol *et al.*, 2008).

**Quadro 2.** Factores estimuladores e inibidores da eritropoiese (Adaptado de Almeida 2014; Crivellenti, 2014).

<b>Factores Indutores</b>	<b><u>Factores Inibidores</u></b>
Eritropoietina (EPO-EPO; EPO Fc)	<u>PTH</u>
IL-3	<u>TNF-<math>\alpha</math></u>
Inibidores do GATA (K-7174; K-11706)	<u>IFN-<math>\gamma</math></u>
Estabilizadores do HIF (FG-2216)	<u>IL-1<math>\beta</math></u>

A capacidade de resposta das células progenitoras eritróides à EPO parece estar inversamente relacionada com a gravidade da doença crónica subjacente e à quantidade de citocinas circulantes, uma vez que, na presença de altas concentrações do IFN- $\gamma$  ou de TNF- $\alpha$ , quantidades muito elevadas de EPO são necessárias para restaurar a formação de unidades geradoras de colónias eritroides (Means & Krantz, 1991; Weiss & Goodnough, 2005).

Estudos realizados em 2008, comprovaram uma forte relação entre a anemia e a inflamação crónica e sugeriram que a inflamação crónica está associada a menores concentrações de hemoglobina mesmo nos estágios iniciais de IRC (Chonchol *et al.*, 2008).

Durante a inflamação também ocorre um aumento da eritrofagocitose, o que leva à redução da semi-vida dos eritrócitos, e, por consequente, a um dano antecipado nos eritrócitos que é mediada por citocinas e radicais livres (Weiss & Goodnough, 2005).

## 2.2. HIPÓXIA

Conforme já referido, a hipóxia é uma depleção parcial de oxigénio (Razvickas *et al.*, 2013).

Na maioria dos seres vivos, para que todos os órgãos alimentem vários processos bio-metabólicos e mantenham a homeostase biológica, o oxigénio é essencial. O equilíbrio entre o consumo de oxigénio e o suprimento é fundamental, especialmente para os rins, que permanecem sempre numa condição metabólica ativa e estão em alta necessidade de oxigénio. Assim, a hipóxia, ou seja, o fornecimento insuficiente de oxigénio, está estreitamente relacionada com o progresso da DRC (Liu *et al.*, 2017).

A indução de hipóxia durante a DRC é multifatorial, podendo ser causada pelo aumento do consumo de oxigénio, pelo mau funcionamento da microcirculação, pela remodelação vascular ou por uma anemia associada à redução da emissão de oxigénio (Liu *et al.*, 2017).

Uma resposta fisiológica clássica à hipóxia sistémica é o aumento da produção de glóbulos vermelhos (Haase, 2013). Em resposta à hipóxia, é a família de fatores induzidos por hipóxia (HIF) que desempenha um papel fundamental, contribuindo para a homeostase renal, bem como para a fisiopatologia em doenças renais (Liu *et al.*, 2017).

Quando a hipóxia persiste, a sinalização dos HIF conduz a respostas adaptativas para reduzir a requisição de oxigénio e aumentar o seu fornecimento, com o objetivo de alcançar um novo equilíbrio (Liu *et al.*, 2017).

Os HIF orquestram uma resposta, induzindo alterações específicas da expressão génica dos tipos celulares que resultam num aumento da produção de EPO no rim e no fígado, na absorção e utilização de ferro melhorada e em ajustes do microambiente da medula óssea, de modo a facilitar a maturação eritróide e a proliferação dos progenitores eritróides (Haase, 2013).

A via de sinalização dos HIF pode coordenar a eritropoiese a vários níveis, nomeadamente na estimulação da produção de EPO, promovendo a absorção e utilização de ferro, e alterando o microambiente da medula óssea para facilitar a maturação dos progenitores eritroides, assim como, a sua proliferação (Koury & Haase, 2015). Podemos assim afirmar que a produção de EPO é regulada, de certa forma, pelos HIF (Haase, 2013).



A resposta à hipóxia é, assim, um dos mecanismos que os rins processam para contribuir para a adaptação das deficiências em oxigénio e sobreviver em condições patológicas (Liu *et al.*, 2017). A fisiopatologia da hipóxia renal na DRC inclui uma diminuição do suprimento de oxigénio e um aumento no consumo de oxigénio (Hirakawa *et al.*, 2017).

À medida que a DRC avança e na presença de uma baixa tensão inata de oxigénio, os rins sofrem de hipóxia grave (Hirakawa *et al.*, 2017).

A hipóxia renal, ou diminuição da tensão de oxigénio no rim, particularmente no tubulointerstício, é considerado um marcador de prognóstico para a progressão da DRC (Nangaku, 2006; Mimura & Nangaku, 2010).

Em situações de hipóxia, é frequente coexistir inflamação, tendo sido demonstrado que ambas se regulam. A hipóxia pode afetar o recrutamento de células inflamatórias e a produção e secreção de fatores inflamatórios. Por outro lado, as células inflamatórias regulam a ativação dos HIF (Eltzschig & Carmeliet, 2011; Haase, 2015), tendo o papel dos HIF na inflamação renal sido demonstrado como algo vital em vários modelos de doenças renais, incluindo a IRC (Kapitsinou *et al.*, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2015). A inativação da sinalização HIF-1 nas células epiteliais renais está associada à diminuição da infiltração de células inflamatórias na DRC e a uma condição de fibrose renal (Higgins *et al.*, 2007).

#### 2.2.1. FACTORES INDUZÍVEIS DE HIPÓXIA (HIF)

O oxigénio é imperativo para a fosforilação oxidativa mitocondrial, um processo que produz quantidades suficientes de ATP em metazoários. Assim, a resposta celular contra o fornecimento insuficiente de oxigénio é controlada com precisão (Semenza, 2014).

Os fatores de transcrição conhecidos como fatores induzíveis pela hipóxia desempenham um papel central no sistema de defesa da anti-hipóxia (Semenza, 2014), sendo compostos por duas subunidades: HIF- $\alpha$ , uma subunidade sensível ao oxigênio e HIF- $\beta$ , uma subunidade com insensibilidade ao oxigénio (Hirakawa *et al.*, 2017).

Devido às três isoformas de subunidades alfa, os HIF são divididos em três subtipos: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ . Sendo que, os subtipos que principalmente

medeiam a transactivação de genes hipóxicos são os HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (Liu *et al.*, 2017).

Os HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  compartilham 48% da identidade de sequência e são estruturalmente semelhantes, no entanto, os seus padrões de expressão são diferentes, o que pode resultar em regulação divergente de genes alvo. O HIF-1 $\alpha$  é expresso onipresente nos órgãos na maioria dos tipos de células, enquanto a expressão de HIF-2 $\alpha$  é limitada por tecido e é particularmente detetada em órgãos e tecidos altamente vascularizados (Wiesener *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2017).

Em geral, o HIF-1 $\alpha$  gere a adaptação inicial do processo de hipóxia, enquanto a expressão de HIF-2 $\alpha$  inicia após condições de hipóxia prolongadas (Koh & Powis, 2012; Bartoszewska *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

A nível renal, os HIF-1 $\alpha$  são expressos na maioria dos tipos celulares, mas com uma expressão maioritária nas células tubulares, incluindo os túbulos proximais e distais, bem como os segmentos de conexão aos ductos coletores. Nas doenças renais hipoxicas, a manifestação dos HIF-1 $\alpha$ , varia entre inflamação, fibrose, apoptose ou glicólise (Gunaratnam & Bonventre 2009; Haase, 2013; Liu *et al.*, 2017)

Por outro lado, no que diz respeito aos HIF-2 $\alpha$ , a expressão é observada, principalmente, nos fibroblastos intersticiais e nas células endoteliais peri-tubulares, desempenhando um papel dominante na regulação e indução da produção de EPO (Gunaratnam & Bonventre 2009; Haase, 2013; Liu *et al.*, 2017). Os HIF-2 $\alpha$  surgem, assim, como o fator de transcrição que regula a síntese de EPO no rim e no fígado e desempenham um papel crítico na regulação da absorção do ferro a nível intestinal, sendo a sua função na regulação hipóxica fundamentalmente para a eritropoiese (Haase, 2013).

Com o aumento da eritropoiese, a carência de ferro é adicional, havendo necessidade de aumentar a sua absorção intestinal e a sua mobilização das reservas corporais. É aqui que os HIF-2 surgem, não só como o regulador chave da produção renal e hepática de EPO, mas também com um papel crítico na absorção, regulação e utilização de ferro (Haase, 2013).

A hipóxia crónica tem sido considerada como sendo uma condição patológica comum que causa vários tipos de DRC. A acumulação de evidências mostra que os HIF, especialmente HIF-1 $\alpha$ , é um regulador chave da fibrose renal em várias condições patológicas (Li *et al.*, 2015; Kushida *et al.*, 2016), na medida em

que, a sinalização dos HIF-1 $\alpha$  nas células epiteliais renais pode acelerar a fibrogênese na DRC (Liu *et al.*, 2017).

Vários estudos foram realizados com o intuito de perceber quais os papéis dos HIF-1 $\alpha$  e dos HIF-2 $\alpha$  no endotélio glomerular na DRC, tendo sido sugerido por Luo *et al.* (2015) que, em rins com lesão crônica hipertensiva, os valores elevado dos HIF-1 $\alpha$ , contribuíram para a lesão glomerular endotelial inicial, levando à hipertensão e à progressão de fibrose renal (Liu *et al.*, 2017). Esta afirmação é ainda muito controversa, havendo, outros estudos que não suportam um papel crítico do HIF-1 $\alpha$  nas patologias glomerulares endoteliais (Kalucka *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

### 2.3. DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica (DRC) é uma condição caracterizada pela perda gradual da função renal ao longo do tempo (Liu *et al.*, 2017).

A DRC é uma doença debilitante que afeta cerca de 7% das pessoas com idade superior a 30 anos, o que se traduz em mais de 70 milhões de pessoas em países desenvolvidos em todo o mundo (Zhang & Rothenbacher, 2008; Garrido *et al.*, 2016). O aumento da prevalência de diabetes, hipertensão e obesidade, bem como o envelhecimento da população, contribuem decisivamente para perpetuar o aumento da DRC (Coresh *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2010).

Vários estudos documentaram que os pacientes com DRC sofrem maior risco de doenças cardiovasculares do que a população em geral demonstrando maior taxa de mortalidade cardiovascular (Garrido *et al.*, 2016).

A DRC é caracterizada por uma perda lenta e progressiva da função renal e pode ser classificada em cinco estágios diferentes, de acordo com o grau de perda da função renal (Quadro 3) (Abensur, 2010), considerando que o valor normal é de 120ml/min (Fernandes *et al.*, 2015).

**Quadro 3.** Classificação da Doença Renal (Adaptado de Abesur, 2010).

<b>Estágio</b>	<b>Filtração Glomerular</b>	<b>Grau de Insuficiência renal</b>
0	>90 ml/min	Grupo de risco para DRC Ausência de lesão renal
1	>90 ml/min	Lesão renal com função renal normal
2	60-89 ml/min	Insuficiência renal leve ou funcional

3	30-59 ml/min	Insuficiência renal moderada ou laboratorial
4	15-29 ml/min	Insuficiência severa ou clínica
5	<15 ml/min	Insuficiência renal terminal ou dialítica

A doença renal crónica é um estado inflamatório em que os níveis de PCR aumentam, à medida que os pacientes perdem função renal, estando este estado inflamatório associado à presença de anemia (Romão *et al.*, 2006).

A anemia já foi observada em estágios iniciais de IRC (estágio 2) e a sua prevalência e gravidade aumentam à medida que a insuficiência renal avança para estágios mais avançados (Cases-Amenós *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2016).

A causa mais conhecida da anemia por DRC é, como já referido anteriormente, a inadequada produção de EPO, no entanto, vários eventos associados à doença, incluindo inflamação crónica, perda de sangue, deficiências vitamínicas, diminuição da absorção e utilização do ferro, pode contribuir também para a anemia na DRC (Lankhorst & Wish, 2010; Cases-Amenós *et al.*, 2014).

A terapia com eritropoietina recombinante humana (rHuEPO) tem sido utilizada para complicações de anemia associadas a IRC, particularmente em pacientes com doença renal terminal, melhorando a sua qualidade de vida (Moreno *et al.*, 2000; Lankhorst & Wish, 2010).

No entanto, o impacto na morbilidade e mortalidade continua discutível, principalmente devido ao potencial aumento dos efeitos cardiovasculares adversos, nomeadamente, o aumento do risco de acidente vascular cerebral, tromboembolismo venoso e mortalidade (Parfrey *et al.*, 2009; Palmer *et al.*, 2010).

Existe uma variabilidade acentuada na sensibilidade à rHuEPO, sendo que alguns pacientes apresentam respostas fracas (Johnson *et al.*, 2007; Garrido *et al.*, 2016). Essa hipo-responsabilidade ou resistência à terapia com rHuEPO foi associada a inflamação, estresse oxidativo e deficiência de ferro, como causas principais, e também a perda de sangue, hiperparatireoidismo, toxicidade do alumínio e deficiências de vitamina B12 ou folato, como causas menores (Drueke & Eckardt, 2002; Do Sameiro-Faria *et al.*, 2013).

### 2.3.1. INFLAMAÇÃO

A inflamação é a resposta fisiológica a uma variedade de estímulos nocivos, tais como uma lesão tecidual causada por infeção ou dano físico. É um processo

complexo que envolve a participação de várias células e moléculas e pode apresentar diferentes intensidades e durações (Costa *et al.*, 2009).

De forma genérica, a inflamação ou processo inflamatório é a resposta do organismo a qualquer tipo de agressão sofrida (Tracey, 2002), entendendo-se como agressão qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual (Gerard & Rollins, 2001; Moss *et al.*, 2004). No decorrer da lesão dos tecidos, o sistema imune é activado, bastando para isso que ocorra uma resposta inflamatória exagerada, com aumento excessivo do processo inflamatório (Gerard & Rollins, 2001; Vianna *et al.*, 2011).

O agravamento da resposta inflamatória leva à perda de tolerância periférica dos componentes dos próprios tecidos, tornando-se antigénicos deles próprios e desencadeando uma inflamação local (Moss *et al.*, 2004). Esta estimulação imunológica contínua prolonga o processo inflamatório até à destruição tecidual (El Nahas, 2005). Assim, em consequência da ativação inicial, as substâncias mediadoras da resposta inflamatória agem sobre as células alvo, que podem estar localizadas em qualquer compartimento do corpo, levando a diferentes processos mórbidos, tais como a DRC (Moss *et al.*, 2004; Pecoits-Filho *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2011).

Especificamente em relação ao tecido renal, a inflamação participa de forma ativa em vários mecanismos de progressão da lesão renal e em doenças de diversas etiologias (Eddy, 2005; Stenvinkel *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2010). Por exemplo, nas doenças de envolvimento glomerular, postula-se resumidamente a seguinte sequência de eventos:

- 1) a lesão glomerular persistente produz hipertensão capilar, aumento da filtração glomerular e passagem de proteínas para o fluido tubular;

- 2) a proteinúria de origem glomerular aumenta a produção de angiotensina (Ang) II e promove a libertação de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) que induzem a atração de células mononucleares no interstício renal;

- 3) o recrutamento inicial de neutrófilos é substituído por macrófagos e linfócitos T, que desencadeiam a resposta imune, produzindo nefrite intersticial;

- 4) as células tubulares respondem a este processo inflamatório por meio de lesão da membrana basal e pela transição dermoepidérmica (EMT) transformando-se em fibroblastos intersticiais;

5) os fibroblastos formados produzem colagénio, que, por sua vez, causa lesões nos vasos e nos túbulos renais, eventualmente determinando a formação de uma cicatriz (Meguid *et al.*, 2005; Stenvinkel *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2011).

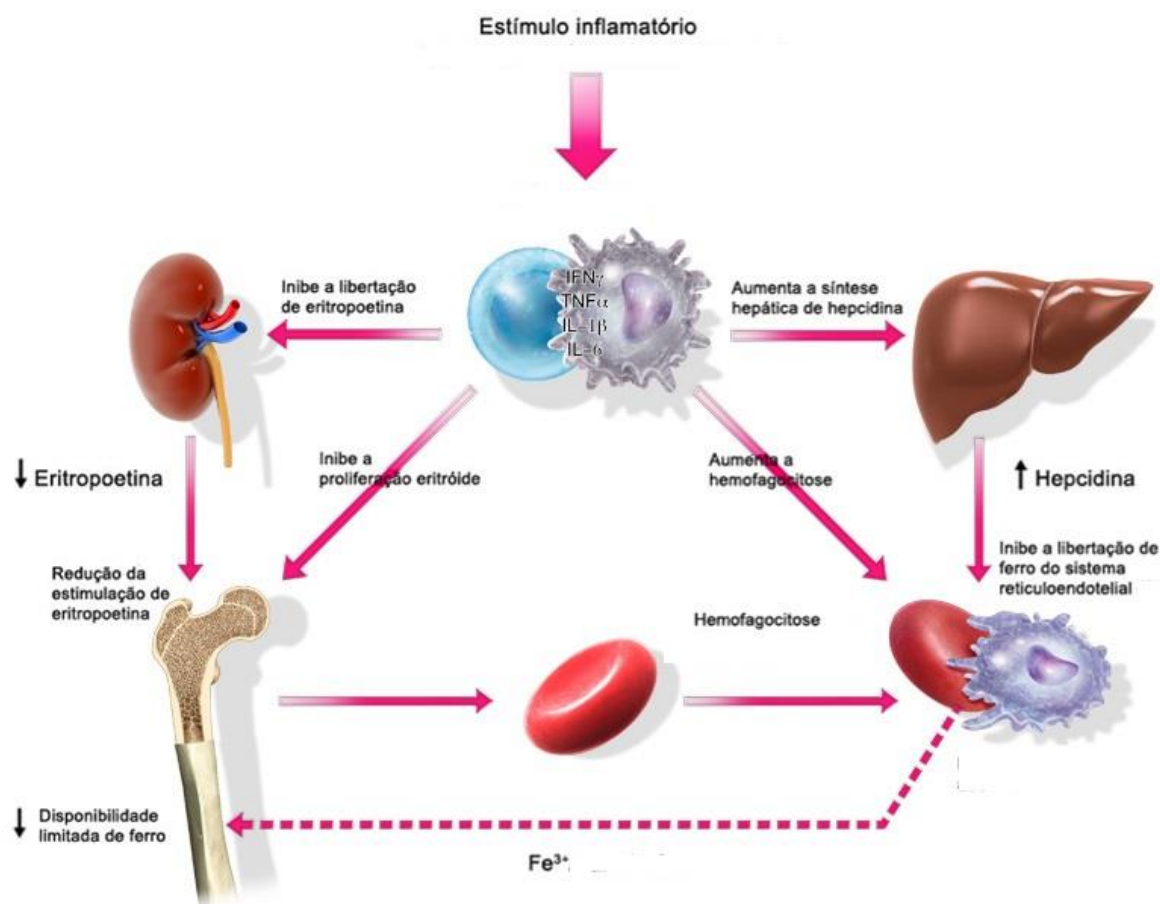
Além das glomerulopatias e doenças autoimunes, nas quais o papel da inflamação é evidente, os estudos têm mostrado que, também outras etiologias da DRC, a resposta inflamatória contribui para a progressão da lesão renal (Meguid *et al.*, 2005; Stenvinkel *et al.*, 2005; Cheun *et al.*, 2010; Vianna *et al.*, 2011).

Estímulos inflamatórios induzem a libertação de citocinas, incluindo o TNF- $\alpha$ , interleucina (IL) -1, IL-6 e o IFN- $\gamma$ , que pode ser produzido por várias células, incluindo leucócitos, fibroblastos e células endoteliais (Costa *et al.*, 2009). Esta libertação de citocinas causa muitas mudanças sistémicas, incluindo o aumento da síntese de proteínas positivas de fase aguda, tais como a PCR e o fibrinogénio (Smrzova *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2009).

As citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina e o TNF, atuam nas células progenitoras eritropoéticas, de maneira oposta à EPO, estimulando a apoptose (Abensur, 2010). Além disto, ao longo de uma resposta inflamatória, o ferro do tráfego de eritropoiese é mobilizado para locais de armazenamento dentro do sistema reticuloendotelial, inibindo a proliferação e diferenciação de progenitores eritróides e, por conseguinte, a resposta à EPO (Costa *et al.*, 2009). Deste modo, podemos dizer que o estado inflamatório da DRC provoca uma situação de resistência à ação medular da eritropoietina (Figura 1) (Abensur, 2010).

Um crítico regulador sensível à homeostase sistémica de ferro, que tem recebido muita atenção, e cuja produção aumenta em situações de inflamação, é a hepcidina (Abensur, 2010; Haase, 2013; Tsuchiya & Nitta, 2013; Ali *et al.*, 2014). A hepcidina, um pequeno peptídeo produzido principalmente pelos hepatócitos, é descrita como um importante regulador da homeostase do ferro corporal, controlando a absorção de ferro enterócito, actuando como inibidor do fluxo de ferro celular nos hepatócitos, enterócitos e nos macrófagos de reciclagem de ferro, através da ligação ao exportador de ferro de ferroportina (Haase, 2013; Preza *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2016a), presente na superfície das células que libertam ferro, provocando a sua degradação (Nemeth *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2016). Por outras palavras, inibe a absorção duodenal de ferro e faz a mobilização de ferro armazenado nas células do sistema reticuloendotelial, possuindo propriedades antimicrobianas e sendo considerado o principal regulador do metabolismo do ferro

(Figura 1) (Ganz, 2007; Abensur, 2010; Haase, 2013; Tsuchiya & Nitta, 2013; Ali *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Esquema resumo do papel da inflamação na diminuição da eritropoietina e da mobilização de ferro (Adaptado de Zarychanski & Houston, 2008).

Em estados de deficiência de ferro, o fígado produz menos hepcidina e a absorção intestinal de ferro é aumentada (Haase, 2013).

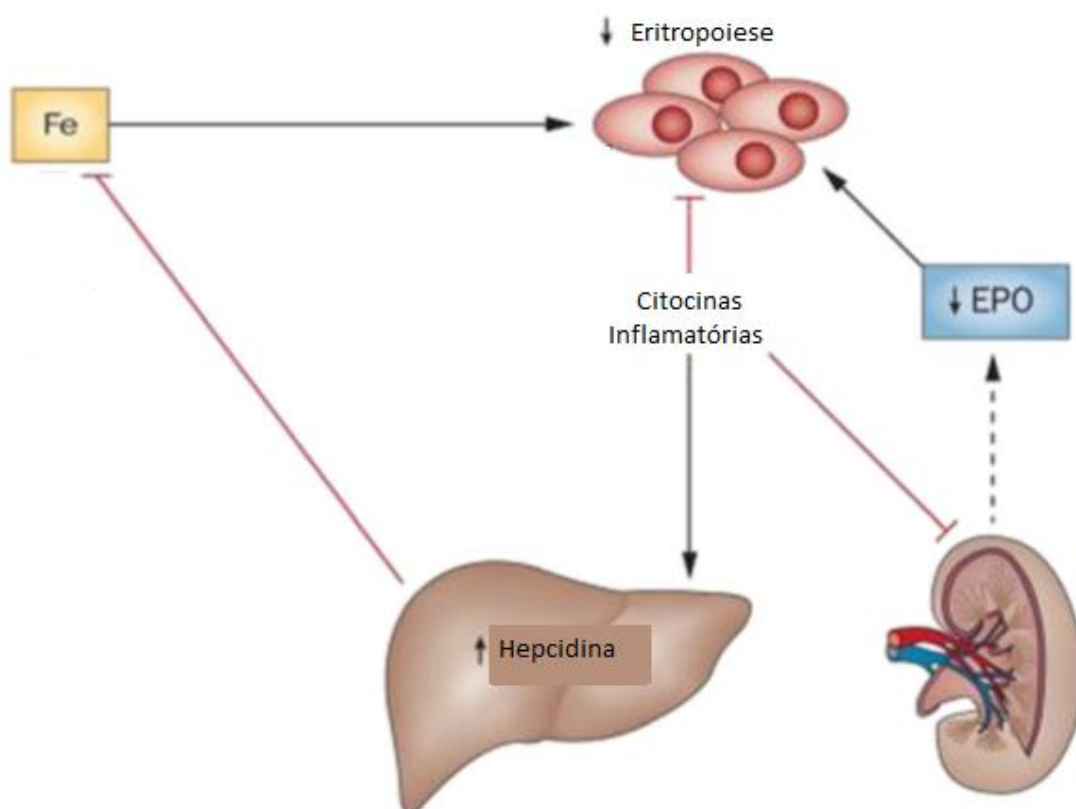
Cronicamente, os níveis séricos elevados de hepcidina são frequentemente associadas com estados inflamatórios (Haase, 2013). Assim, a condição inflamatória desencadeia a produção de hepcidina que inibe a absorção e mobilização de ferro, levando a um desenvolvimento e/ou agravamento da anemia em pacientes com DRC (Nemeth *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2016a).

A inflamação é, assim, outra marca registrada de DRC que pode levar a uma anemia "funcional" deficiente em ferro (Costa *et al.*, 2008; Łukaszyk *et al.*, 2015). Na verdade, vários autores sugerem que a inflamação desempenha um papel importante nos distúrbios no metabolismo do ferro (Ribeiro *et al.*, 2016a).

A restrição de ferro mediada pela hepcidina contribui, assim, para a anemia (através da regulação negativa da absorção intestinal de ferro e da liberação de ferro armazenado para eritropoiese) (Atkinson & Warady, 2017).

A expressão da hepcidina é regulada positivamente por uma variedade de estímulos, como inflamação e sobrecarga de ferro, e negativamente por hipóxia, anemia e deficiência de ferro (Tsuchiya e Nitta, 2013; Ali *et al.*, 2014).

A DRC está associada ao aumento dos níveis séricos de hepcidina, uma vez que esta é filtrada e degradada pelo rim (Ashby *et al.*, 2009), que podem contribuir para o desenvolvimento e gravidade da anemia e para a resistência a agentes estimulantes da eritropoiese (Tsuchiya e Nitta, 2013; Ali *et al.*, 2014). Portanto, na DRC é muito comum a ocorrência de deficiência de ferro absoluta ou funcional, sendo a deficiência absoluta causada pela diminuição da absorção intestinal de ferro ou por perdas sanguíneas (Abensur, 2010). A hepcidina elevada, está, assim, associada à anemia (Ashby *et al.*, 2009) (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática entre a EPO, o ferro e a hepcidina. (Na anemia renal, a capacidade renal para produzir EPO é prejudicada. As citocinas inflamatórias reprimem a eritropoiese na medula óssea e a produção de EPO no rim e estimulam a produção de hepcidina no fígado, o que afecta a absorção e do ferro) (Adaptado de Atkinson & Warady 2017)



Keane & Lyle, em 2003, realizaram um estudo que mostrou uma associação entre a anemia e a progressão da DRC, provando que, os pacientes com DRC anêmicos têm uma perda mais acelerada da função renal e necessitam mais precocemente iniciar programa de diálise (Abensur, 2010).

Os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano. Assim, não é surpresa constatar que, a diminuição progressiva da função renal implique um comprometimento de todos os outros órgãos essenciais. A função renal é avaliada pela filtração glomerular (FG) e a sua diminuição é observada na DRC, associada a perda das funções regulatórias, excretórias e endócrinas do rim (Bastos *et al.*, 2010).

O reaproveitamento da EPO é o principal instrumento de tratamento da anemia na insuficiência renal, refletindo a importância da EPO produzida a nível renal na regulação do hematócrito. No entanto, agora é reconhecido que a sensibilidade à terapia da EPO na doença renal terminal é muitas vezes limitada pelo defeito funcional na disponibilidade de ferro e, na maioria dos pacientes, a terapia de ferro intravenosa melhora a resposta (Ashby *et al.*, 2009). A resistência à EPO tem sido associada ao aumento da mortalidade em doença renal (Zhang *et al.*, 2004; Ashby *et al.*, 2009) e há preocupações de que a administração de ferro intravenosa regular possa ter consequências adversas (Bishu *et al.*, 2006; Zager, 2006; Ashby *et al.*, 2009).

### 2.3.2. LESÕES RENAIAS

A fibrose renal é uma característica patológica da DRC (Liu *et al.*, 2017), a perda de capilares peritubulares (PTCs) (Kang *et al.*, 2001, Ohashi *et al.*, 2002), a redução no fluxo de PTC (Matsumoto *et al.*, 2004) e a anemia renal (Astor *et al.*, 2002) são reflexo do fornecimento insuficiente de oxigénio (Hirakawa *et al.*, 2017).

As áreas medulares externas, incluindo o segmento S3 dos túbulos proximais, os segmentos ascendentes espessos medulares e os ductos colectores medulares, são consideradas mais suscetíveis à hipóxia porque as alterações histológicas são óbvias nesses segmentos de rins humanos com isquémia (Heyman *et al.*, 2010; Hirakawa *et al.*, 2017).

A DRC é caracterizada pela fibrose glomerular e/ou túbulo-intersticial progressiva, lesões capilares peritubulares por hipóxia e perda do funcionamento

dos nefrônios por esclerose glomerular e atrofia tubular, independentemente do mecanismo primário que desencadeou a lesão renal (Tracey, 2002; Vianna *et al.*, 2011). Nesse processo fisiopatológico da progressão da lesão renal tem sido cada vez mais detectada a participação dos mecanismos inflamatórios (Vianna *et al.*, 2011).

Em 2006, Remuzzi e colaboradores, descreveram hipertrofia dos nefrônios remanescentes em ratos dos quais 80% do tecido renal havia sido removido. Visto que, os rins se viram obrigados a trabalhar normal, este aumento de volume, foi interpretado como uma possível adaptação para superar a desvantagem imposta pela perda de nefrônios (Remuzzi *et al.*, 2006).

Em 1975, Shimamura & Morrison detetaeram hialinização da estrutura glomerular após nefrectomia parcial de cinco sextos em animais.

Brenner e os seus colaboradores (2002), esclareceram a fisiopatologia da adaptação renal à perda de nefrônios, tendo verificado que, após a remoção da massa renal, a resistência arteriolar diminui e o fluxo plasmático aumenta em glomérulos remanescentes (Hostetter *et al.*, 1981; Brenner, 2002; Remuzzi *et al.*, 2006).

Com o aumento da pressão arterial sistêmica, a vasodilatação da arteríola aferente e a vasoconstrição da arteríola eferente, a pressão hidráulica capilar glomerular aumenta, levando a uma maior capacidade de filtração por parte dos nefrônios (Anderson *et al.*, 1985; Remuzzi *et al.*, 2006)

Em 2014, Costa e colaboradores, exibiram várias lesões histomorfologicas a nível renal de animais com DRC. Destacaram, a nível glomerular, lesões como: espessamento da Cápsula de Bowman, hialinose do pólo vascular, dilatação do espaço de Bowman e hiper celularidade. Já a nível tubular, os ratos em estudo, apresentaram lesões, tais como: fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA), infiltração inflamatória intersticial, cilindros hialinos e degenerescência tubular vacuolar. No que diz respeito às lesões vasculares, citaram arteriosclerose e arteriolosclerose (Costa *et al.*, 2014).

### **3. COMPONENTE PRÁTICA**

#### **3.1. MATERIAL E MÉTODOS**

No presente estudo foram avaliadas 24 amostras histopatológicas constituídas por rins de ratos, provenientes do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental (IBILI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os rins foram recolhidos após o sacrifício dos ratos, fixados em formol a 10% e posteriormente enviados para o Laboratório de Anatomia Patológica da ESAV, onde foram processados e corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

##### **3.1.1. CRITÉRIOS PARA OBTER A POPULAÇÃO**

Os ratos Wistar machos (Charles River Lab., Inc., Chatillon-sur-Chalaronne, França), de 10 semanas de idade, foram mantidos em gaiolas ventiladas, em uma sala com ar condicionado, submetidos a 12 h de ciclos de luz / escuridão e acesso livre a comida de laboratório de ratos e água da torneira.

Todos os animais receberam cuidados humanos e foram conduzidos de acordo com as Diretrizes do Conselho das Comunidades Europeias sobre Cuidados com Animais. Os procedimentos foram aprovados pelo Comité de Ética Local (ORBEA: Organização Responsável pelo Bem-estar Animal) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

As amostras de sangue foram coletadas com ratos sob anestesia (intraperitoneal) com 1,4 mg / kg de peso corporal de uma solução de ketamina a 100 mg / mL de 2: 1 (v: v) (Imalgene® 1000, Lyon, França) em 2,5% de clorpromazina (Largactil®, Rhône-Poulenc Rorer, Lab. Vitória, Amadora, Portugal). As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular, nos tubos Vacuette® (Greiner Bio-One GmbH, Alemanha) sem anticoagulante (para obter soro) ou com K3EDTA para estudos hematológicos e bioquímicos. Alíquotas de soro e plasma foram imediatamente armazenadas a -80°C até serem ensaiadas.

No final do protocolo, após a colheita de sangue e sob anestesia, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os rins foram imediatamente removidos e colocados em tampão frio Krebs-Henseleit, limpos e ponderados. Para análise histopatológica, as amostras foram fixadas em formol neutro a 10% e posteriormente desidratadas (através da transferência do tecido entre soluções de aumento da concentração alcoólica, até atingir 100% de álcool, clareadas com xilol e

embebidas em parafina. Obteve-se secções de cerca de 3 µm de espessura, colocadas numa lâmina, desparafinizadas (com solução de xilol) e reidratadas (com decréscimo da concentração de álcool, até atingirem álcool a 70% e água). As lâminas foram então coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e, em seguida, percorreram o processo inverso, para atingir a desidratação, passando pelo aumento da concentração de álcool e xilol. Por fim, os slides foram revestidos usando uma montagem permanente.

Todas as amostras foram examinadas por microscopia de luz usando um microscópio Zeiss Mod. Axioplan 2. O grau de lesão visível por microscopia de luz foi pontuado de forma duplo-cega por dois patologistas. As lesões foram avaliadas no tecido total na lâmina.

### 3.1.2. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

A população de animais em estudo foi formada por um grupo de 24 ratos, divididos em grupos distintos (Quadro 4).

O Grupo 1 (G1), ou grupo controlo, diz respeito a animais que serviram apenas para recolha de sangue para estudos hematológicos e bioquímicos, tendo sido logo sacrificados. Neste grupo, não são esperadas quaisquer lesões histopatológicas, sendo animais sem anemia e com valores de Hb superior a 13g/dL.

O Grupo 2 (G2), ou grupo controlo com flebotomia, diz respeito a animais em que foi tirado sangue no primeiro dia para estudos hematológicos e bioquímicos, tendo sido feita uma nova colheita passados três dias, sendo de seguida os animais sacrificados. Neste grupo, os valores de Hb obtidos na segunda recolha, resultam apenas de uma recolha antecedente, pelo que, não é esperada uma anemia muito acentuada, com o valor de Hb compreendido entre 11g/dL e 12g/dL, e, por isso, um número reduzido de lesões, ou mesmo nenhuma.

O grupo 3 (G3), ou grupo de animais anémicos, foram divididos em 3 subgrupos de acordo com os valores de Hb, resultantes de colheitas de sangue realizadas em dias seguintes, num total de 4 colheitas. O sangue recolhido no último dia foi o utilizado para os estudos, sendo que os animais foram sacrificados após esta colheita. Nestes grupos, é de esperar que, quanto mais baixo for o valor de Hb, mais lesões se encontrarão, pois maior será a hipóxia renal.

Os subgrupos do G3 foram assim divididos em: G3a, em que a Hb tem um valor superior a 10g/dL; G3b, em que a Hb tem um valor compreendido entre 9,5g/dL e 10g/dL, inclusive; e grupo G3c, em que a Hb tem um valor inferior ou igual a 9,5g/dL.

**Quadro 4.** Grupos de Trabalho

Grupo		Hb	Rato
G1		Hb> 13	W22
			W26
			W27
			W28
G2		11 <Hb> 12	W1
			W3
			W10
			W14
			W21
			W25
G3	G3a	Hb>10	W6
			W8
			W16
			W23
	G3b	9,5<Hb≥10	W2
			W5
			W13
			W18
			W19
	G3c	Hb≤9,5	W4
			W7
			W12
			W20
			W24

### 3.1.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES RENAIIS

Em 2006, Tervaert e os seus colaboradores, a pedido do Comité de Pesquisa da Sociedade de Patologia Renal desenvolveram uma classificação

consensual que combinou nefropatias diabéticas (ND) tipo 1 e tipo 2, com o intuito de combater a falta de uma classificação uniforme para a nefropatia diabética e criar assim uma classificação fácil de usar na prática clínica internacional (Tervaert *et al.*, 2010), que consideramos adaptável ao presente estudo.

Esta classificação divide as lesões glomerulares em quatro graus hierárquicos:

- **Grau I:** existe um espessamento da membrana basal glomerular (MBG) isolado e apenas alterações leves e inespecíficas, que não atendem aos critérios das classes seguintes (Tervaert *et al.*, 2010).
- **Grau II:** os glomérulos apresentam uma expansão mesangial leve (GIIA) ou grave (GIIB) mas sem esclerose nodular (lesões de Kimmelstiel-Wilson) ou glomerulosclerose global em mais de 50% dos glomérulos. A expansão mesangial é definida como um aumento em material extracelular no mesângio. A diferença entre a expansão mesangial leve (A) e severa (B) baseia-se no aumento da largura da região mesangial ou da largura do leito capilar. Se for visualizado em mais de 25% do mesângio total observado, é classificada como GIIB (Tervaert *et al.*, 2010).
- **Grau III:** presença de esclerose nodular (lesões de Kimmelstiel-Wilson), sendo necessário apenas um glomérulo com aumento nodular da matriz mesangial, mas sem as lesões que caracterizam o grau IV. Se pelo menos uma lesão convincente de Kimmelstiel-Wilson for encontrada e a preparação histopatológica não tiver mais de 50% de glomerulosclerose global, será classificada como grau III. (As lesões de Kimmelstiel-Wilson aparecem como lesões mesangiais focais, lobulares, redondas a ovais, com um núcleo acelular, hialino / matriz, arredondadas perifericamente por núcleos mesangiais escassos em forma de lua e são frequentemente encontradas em combinação com expansão mesangial) (Tervaert *et al.*, 2010).
- **Grau IV:** glomeruloesclerose avançada, com mais de 50% de glomerulosclerose global e com outras evidências clínicas ou patológicas. É o ponto final de mecanismos multifatoriais que levam à acumulação excessiva de proteínas da matriz extracelular, como os tipos de colágeno I, III e IV e a fibronectina no espaço mesangial, que, por meio de períodos de expansão mesangial e desenvolvimento de lesões de Kimmelstiel-Wilson, resultam finalmente em glomerulosclerose (Tervaert *et al.*, 2010).

Contudo, em 2014, Costa e os seus colaboradores, destacaram a avaliação da expansão mesangial e da membrana basal glomerular, o espessamento da cápsula de Bowman, a esclerose nodular, a glomeruloesclerose, a atrofia, a hialinose do pólo vascular e a hiper celularidade, como importantes lesões a nível glomerular provocadas por hipóxia (Costa *et al.*, 2014).

Concomitantemente ao aparecimento de lesões glomerulares definidas como grau II, começa a ser evidente o espessamento da membrana basal dos túbulos. A IFTA são alterações que seguem também alterações glomerulares. A IFTA é avaliada consuante a percentagem da área total envolvida de interstício e túbulos, sendo atribuída uma pontuação. A pontuação 0 é atribuída quando a lâmina não mostra IFTA, uma pontuação de 1 é atribuída quando menos de 25% de IFTA está presente, uma pontuação de 2 é atribuída quando pelo menos 25% mas menos de 50% da lâmina tem IFTA e, finalmente, a pontuação 3 é atribuído quando há pelo menos 50% de IFTA presente (Tervaert *et al.*, 2010).

A presença de células mononucleares no interstício é um achado bem reconhecido. Os infiltrados inflamatórios intersticiais compreendem linfócitos T e macrófagos, sendo também atribuída uma pontuação para melhor classificar esta alteração. Assim, é atribuída a pontuação 0 se os infiltrados intersticiais estiverem ausentes, 1 se ocorrerem apenas em torno de túbulos atroficos e 2 se o infiltrado inflamatório estiver também em outras áreas para além de em torno de túbulos atroficos (Tervaert *et al.*, 2010).

Em 2014, Costa, juntamente com os seus colaboradores, associaram ainda o infiltrado inflamatório, a presença de cilindros hialinos, irregularidades da membrana basal dos túbulos e calcificação tubular, como lesões tubulo-intersticiais a ser avaliadas (Costa *et al.*, 2014).

A hialinose arteriolar aferente ocorre em vários contextos, sendo atribuída também uma pontuação para melhorar a sua classificação. Assim, atribuímos 0 se não houver hialinose arteriolar, 1 se houver uma arteriola com hialinose e 2 se mais de uma arteriola for observada em toda preparação histopatológica (Tervaert *et al.*, 2010).

A arteriosclerose é também uma alteração comum, estando descrito que o aumento da patologia vascular está associado a uma patologia glomerular mais grave (Tervaert *et al.*, 2010). Para classificar a arteriosclerose, é seleccionada a artéria mais gravemente afetada da preparação histopatológica e atribuída uma

pontuação, sendo, 0 se não houver espessamento intimal, 1 se o espessamento intimal for menor que a espessura da média e 2 se o espessamento intimal for maior que a espessura da média (Tervaert *et al.*, 2010).

Em 2014, Costa *et al.*, concentraram a avaliação das lesões vasculares na hialinose vascular, arteríolosclerose e arteriosclerose, sendo a pontuação atribuída às duas primeiras lesões a mesma usada por Tervaert *et al.*, em 2010 (Costa *et al.*, 2014).

Congestão, hemorragia, edema, hiperémia e vacuolização arteriolar, foram outras lesões avaliadas, no presente trabalho, a nível vascular. Segundo os trabalhos de Costa *et al.*, (2014), também aqui foi realizada uma classificação quantitativa para cada lesão, variando de normal ou mínima, a grave, quando os danos eram extensos. A gravidade foi, assim, classificada como 0 para ausente, 1 para leve, 2 para moderado e 3 para grave. A pontuação foi definida de acordo com a extensão ocupada pela lesão, sendo, deste modo, atribuída a pontuação de 0% para normal, <25% para suave, 25-50% para moderado e > 50% para grave.

Esta classificação foi utilizada, ainda, para avaliar, a nível tubular, a calcificação, os cilindros hialinos, hemossidrínicos e granuloso, a necrose, a reabsorção, as gotas hialinas e irregularidade da membrana basal.

A aquisição de imagens do presente trabalho foi realizada com câmara de microscópio digital (Leica DFC450) e o processamento de imagens foi realizado com o pacote LAS Advanced Analysis Software (No: 12730448.).

De modo a facilitar o estudo das lesões renais e simplificar a análise dos resultados, foram elaborados 6 gráficos distintos com as lesões vasculares, glomerulares e tubulares (Quadros 5, 6, 7, 8, 9 e 10).



**Quadro 5.** Lesões vasculares estudadas nos grupos de animais controle.

Lesões		Grupos									
		G1				G2					
		W22	W26	W27	W28	W1	W3	W10	W14	W21	W25
Lesões Vasculares	Congestão	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
	Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hiperémia	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Vacuolização Arteriolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hialinose Arteriolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Arterioloesclerose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Arteriosclerose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Quadro 6.** Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anêmicos.

Lesões		Grupos													
		Anêmicos (G3)													
		G3a				G3b					G3c				
		W6	W8	W16	W23	W2	W5	W13	W18	W10	W4	W7	W12	W20	W24
Lesões Vasculares	Congestão	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2
	Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hiperémia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vacuolização Arteriolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hialinose Arteriolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Arterioloesclerose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Arteriosclerose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Quadro 7.** Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais controlo.

Lesões		Grupos									
		G1				G2					
		W22	W26	W27	W28	W1	W3	W10	W14	W21	W25
Lesões Glomerulares	MBG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Expansão Mesangial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esclerose Nodular KW	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Glomeruloesclerose Global (Dif)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hialinose pólo vascular glomerular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Espessamento da C. de Bowman	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Atrofia Glomerular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hipercelularidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dilatação do Espaço de Bowman	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Quadro 8.** Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anêmicos.

Lesões		Grupos													
		Anêmicos (G3)													
		G3a				G3b					G3c				
		W6	W8	W16	W23	W2	W5	W13	W18	W10	W4	W7	W12	W20	W24
Lesões Glomerulares	MBG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Expansão Mesangial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esclerose Nodular KW	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Glomeruloesclerose Global (Dif)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hialinose pólo vascular glomeru.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Espessamento da C. de Bowman	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Atrofia Glomerular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hiper celularidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
	Dilatação do Espaço de Bowman	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Quadro 9.** Lesões tubulares estudadas no grupo de animais controlo.

Lesões		Grupos									
		G1				G2					
		W22	W26	W27	W28	W1	W3	W10	W14	W21	W25
Lesões Tubulares	Cilindros hialinos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cilindros hemossidrínicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Cilindros granulosos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Reabsorção tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gotas hialinas tubulares	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Calcificação tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Necrose tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Irregularidade da MBT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Deg. Cito	Tumefação celular									
		Deg. Hidrópica									
		Deg. Vacuolar									
	FIAT/IFTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatório	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dilatação Tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Quadro 10.** Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anêmicos.

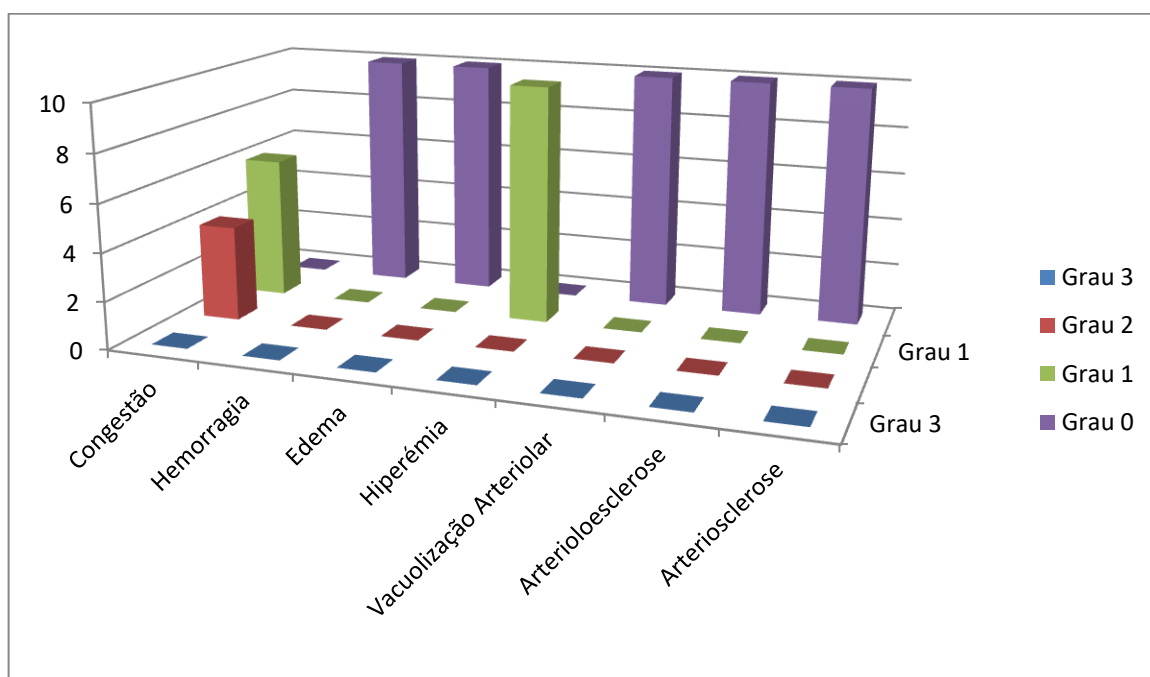
Lesões		Grupos													
		Anêmicos (G3)													
		G3a				G3b					G3c				
		W6	W8	W16	W23	W2	W5	W13	W18	W10	W4	W7	W12	W20	W24
Lesões Tubulares	Cilindros hialinos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cilindros hemossidrínicos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cilindros granulosos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Reabsorção tubular	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Gotas hialinas tubulares	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
	Calcificação tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Necrose tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Irregularidade da MBT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Deg. Cito	Tumefação celular		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Deg. Hidrópica		0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
		Deg. Vacuolar		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	FIAT/IFTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltrado inflamatório	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2
	Dilatação Tubular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 3.2. RESULTADOS

Relativamente às lesões vasculares estudadas nos grupos de animais controlo, verificou-se que a maioria dos animais não apresentava nenhuma das lesões em estudo, tendo sido atribuído o grau 0 para hemorragia, edema, vacuolização Arteriolar, Arteioloesclerose e Arteriosclerose (n=10) (Figura 3).

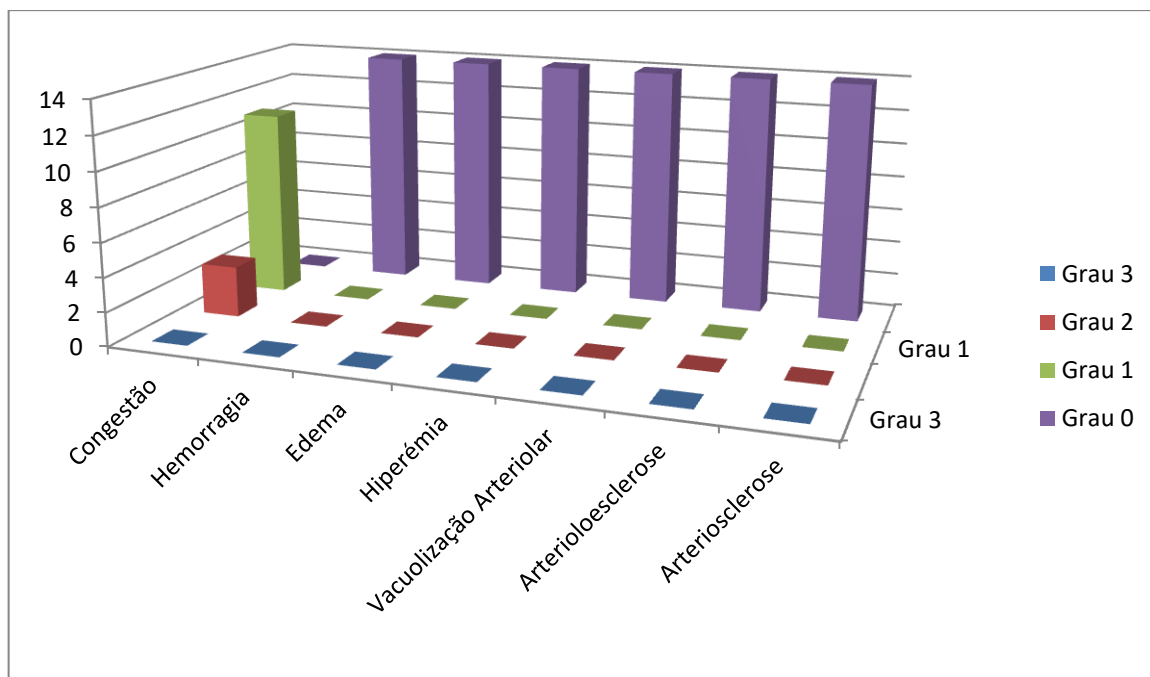
Verificou-se que a congestão estava presente em todos os animais, com 60% (n=6) de grau 1 e 40% de grau 2 (Figura 3).

Verificou-se também que todos os animais apresentavam hiperémia (n=10) (Figura 3).



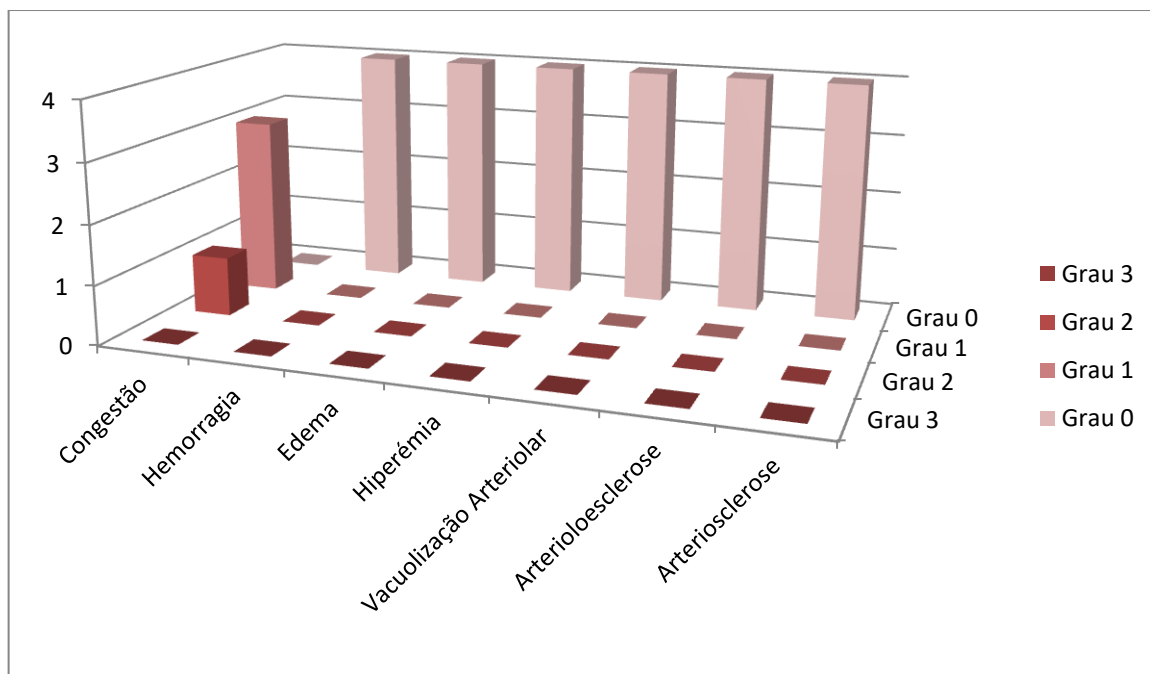
**Figura 3.** Lesões vasculares estudadas nos grupos de animais controlo.

Relativamente às lesões vasculares estudadas nos grupos de animais anémicos, verificou-se que todos os animais apresentavam congestão (n=14), e que nenhum apresentava as restantes lesões em estudo, tendo sido atribuído o grau 0 para hemorragia, edema, vacuolização Arteriolar, Arteioloesclerose e Arteriosclerose (n=14) (Figuras 4).



**Figura 4.** Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anêmicos.

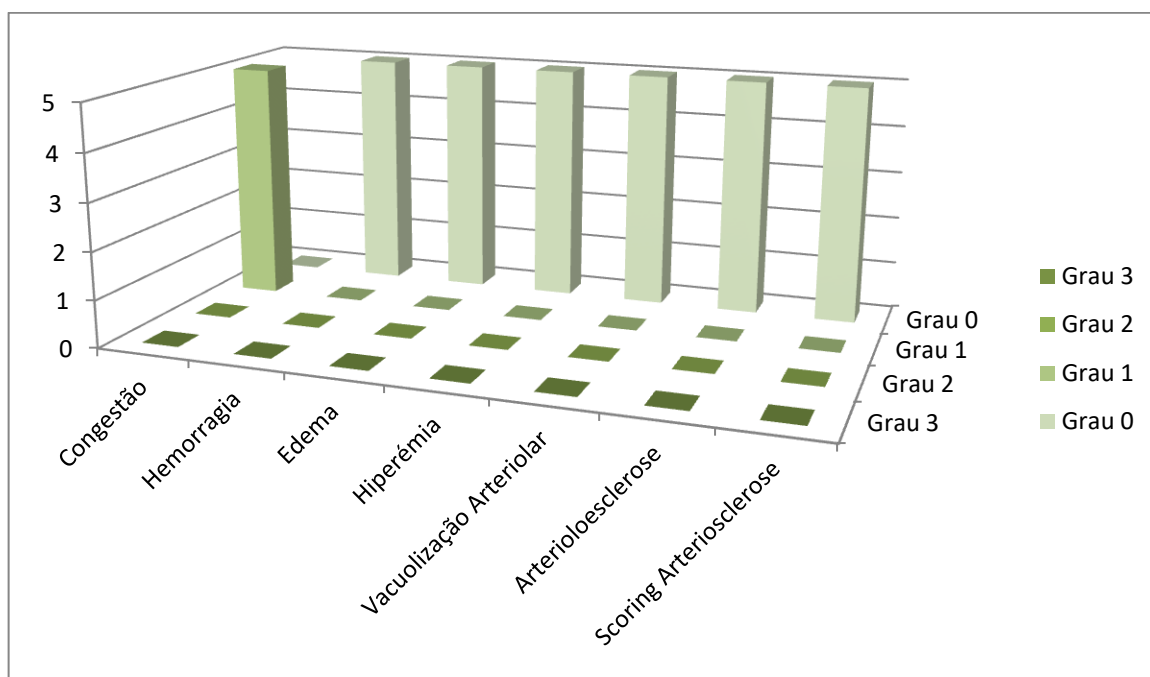
Relativamente às lesões vasculares estudadas nos grupos de animais anêmicos 3a, verificou-se que a congestão estava presente em graus diferentes dentro do mesmo grupo, com 75% (n=3) de grau 1 e 25% (n=1) de grau 2 (Figura 5).



**Figura 5.** Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anêmicos G3a.

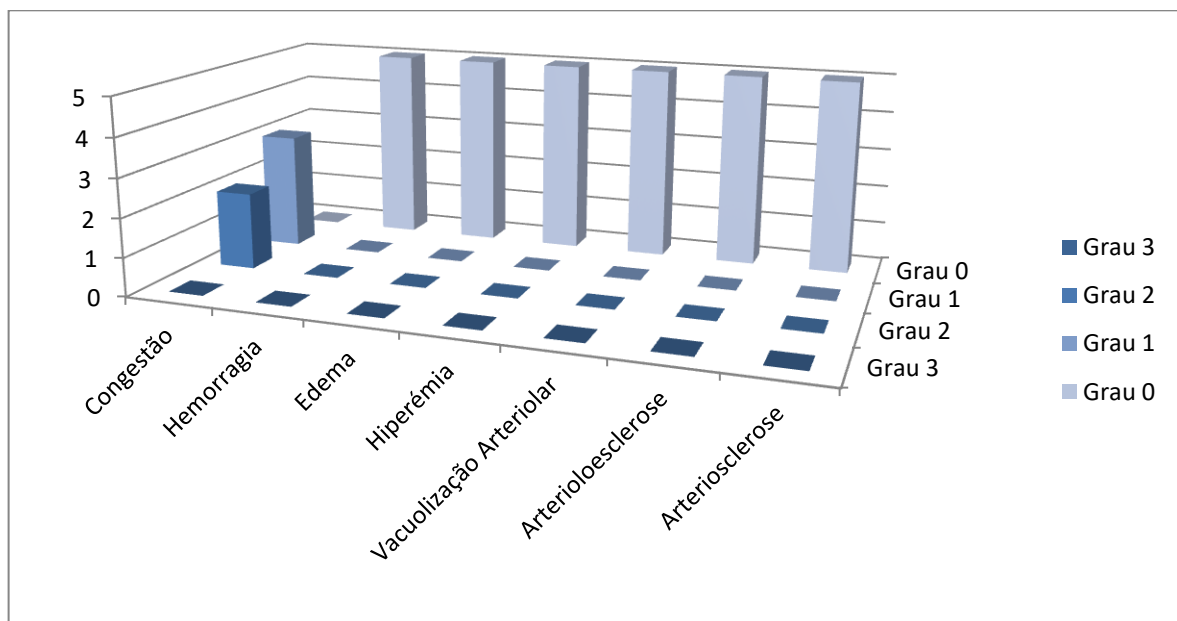


Relativamente às lesões vasculares estudadas nos grupos de animais anêmicos 3b, verificou-se que a congestão estava presente em todos os animais do grupo (n=5), com grau 1 (Figura 6).



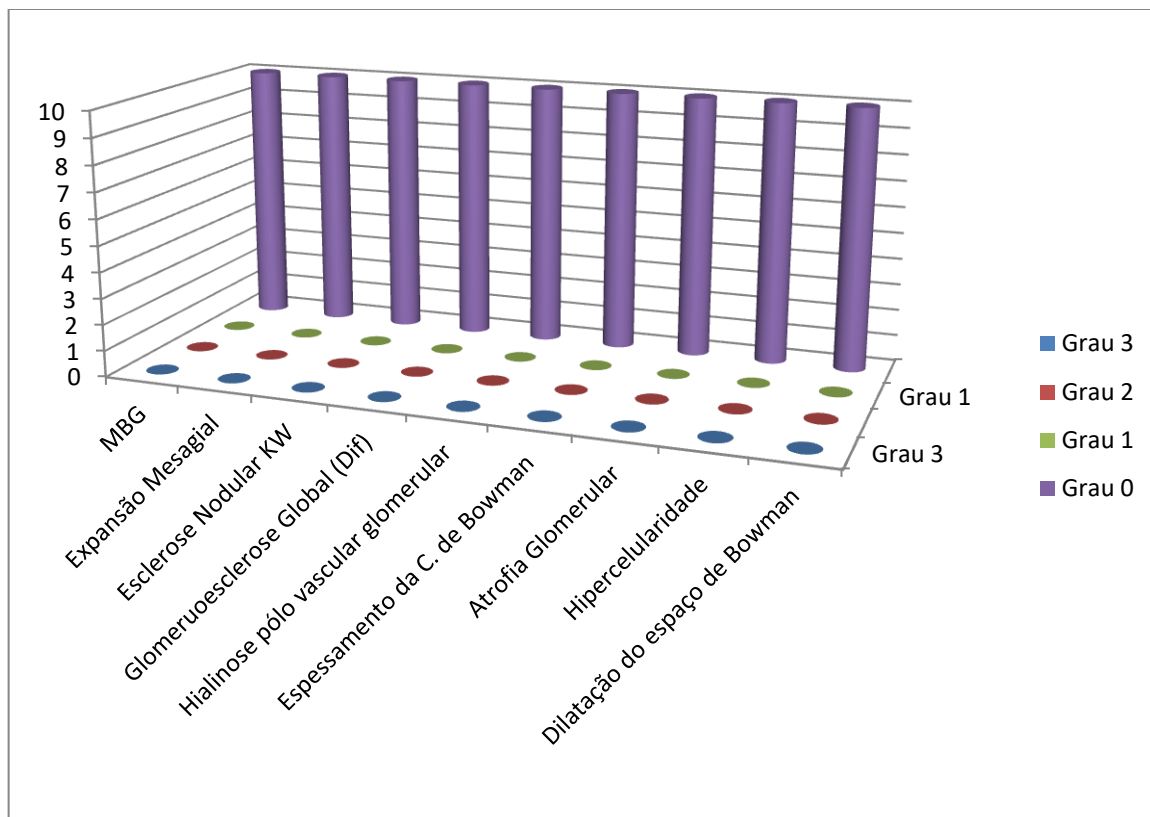
**Figura 6.** Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anêmicos G3b.

Relativamente às lesões vasculares estudadas nos grupos de animais anêmicos 3c, verificou-se que a congestão estava presente em graus diferentes dentro do mesmo grupo, com 60% (n=3) de grau 1 e 40% (n=2) de grau 2 (Figura 7).



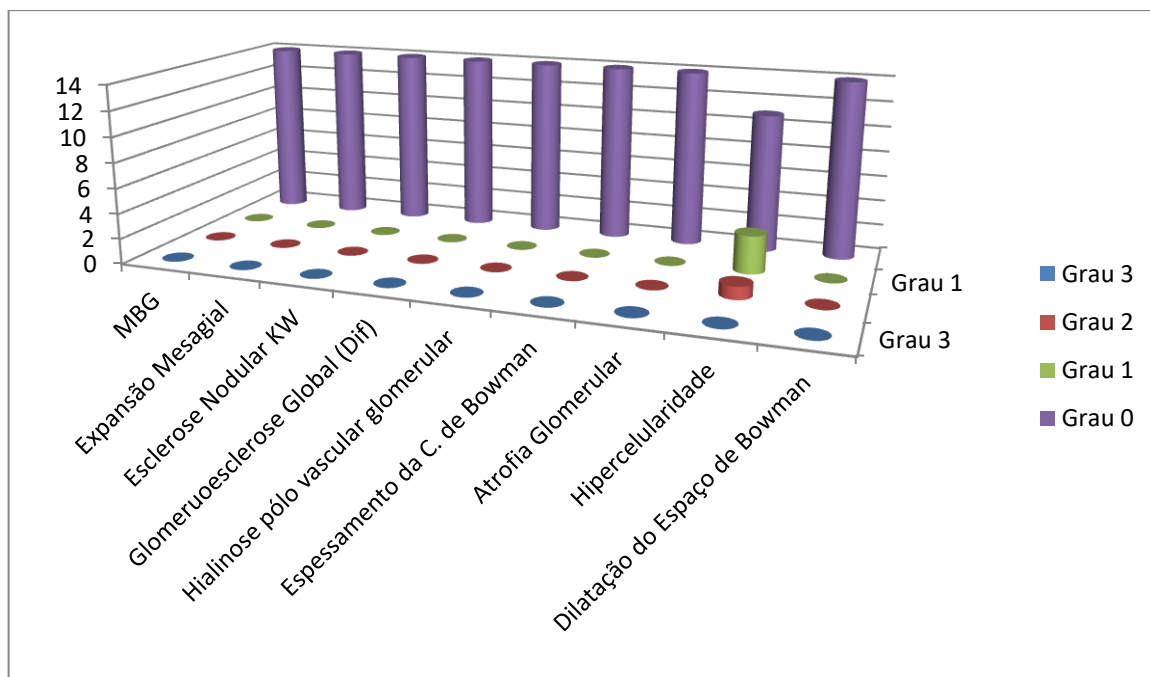
**Figura 7.** Lesões vasculares estudadas no grupo de animais anêmicos G3c.

Relativamente às lesões glomerulares estudadas nos grupos de animais controlo, verificou-se que nenhuma estava presente, tendo sido atribuído o grau 0 para todas as lesões (n=10) (Figura 8).



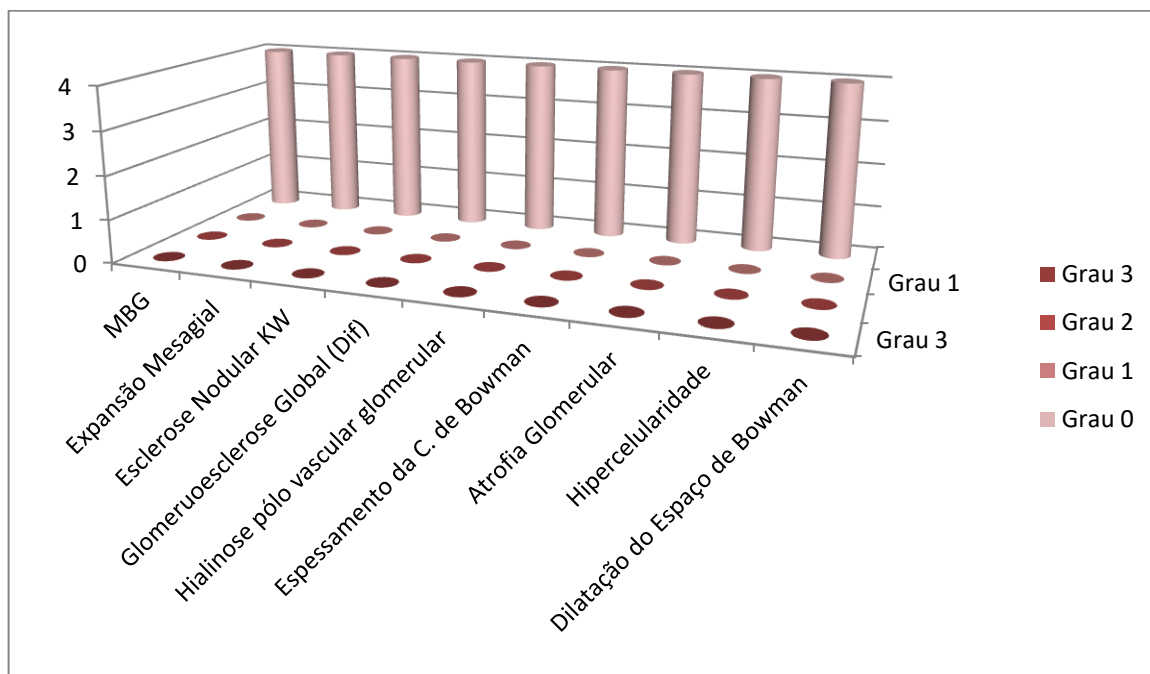
**Figura 8.** Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais controlo.

Relativamente às lesões glomerulares estudadas nos grupos de animais anémicos, verificou-se que 29% dos animais em estudo apresentavam hiperclularidade (n=4), sendo, aproximadamente, 21,4% (n=3) de grau 1 e 7,1% (n=1) de grau 2. Constatou-se ainda que nenhum animal apresentava as restantes lesões em estudo, tendo sido atribuído o grau 0 para MBG, expansão mesangial, esclerose nodular, glomerulosclerose global, hialinose do pólo vascular glomerular, espessamento da cápsula de Bowman e atrofia glomerular (n=14) (Figura 9).



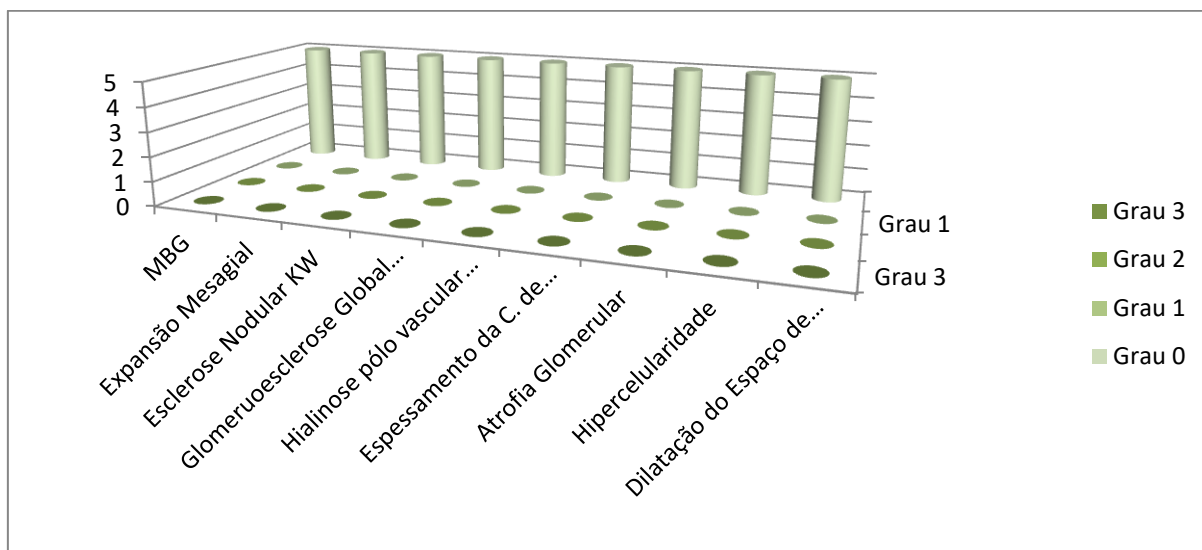
**Figura 9.** Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anêmicos.

Relativamente às lesões glomerulares estudadas nos grupos de animais anêmicos 3a, verificou-se nenhuma das lesões em estudo estava presente, tendo sido atribuído o grau 0 a 100% (n=4) dos casos (Figura 10).



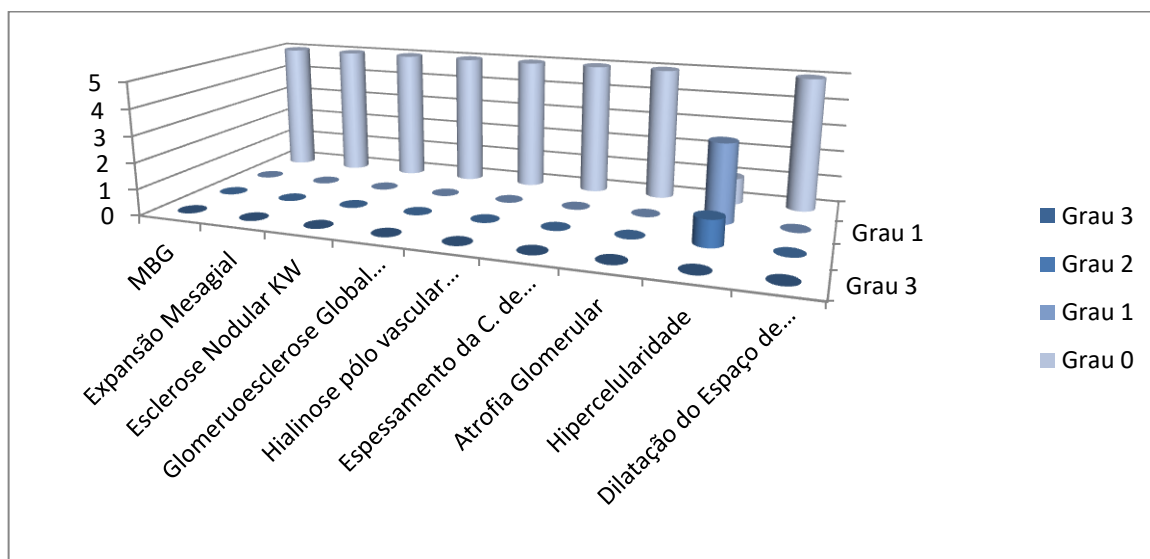
**Figura 10.** Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anêmicos G3a.

Relativamente às lesões glomerulares estudadas nos grupos de animais anémicos 3b, verificou-se que nenhuma das lesões em estudo estava presente, tendo sido atribuído o grau 0 a 100% (n=4) dos casos (Figura 11).



**Figura 11.** Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anémicos G3b.

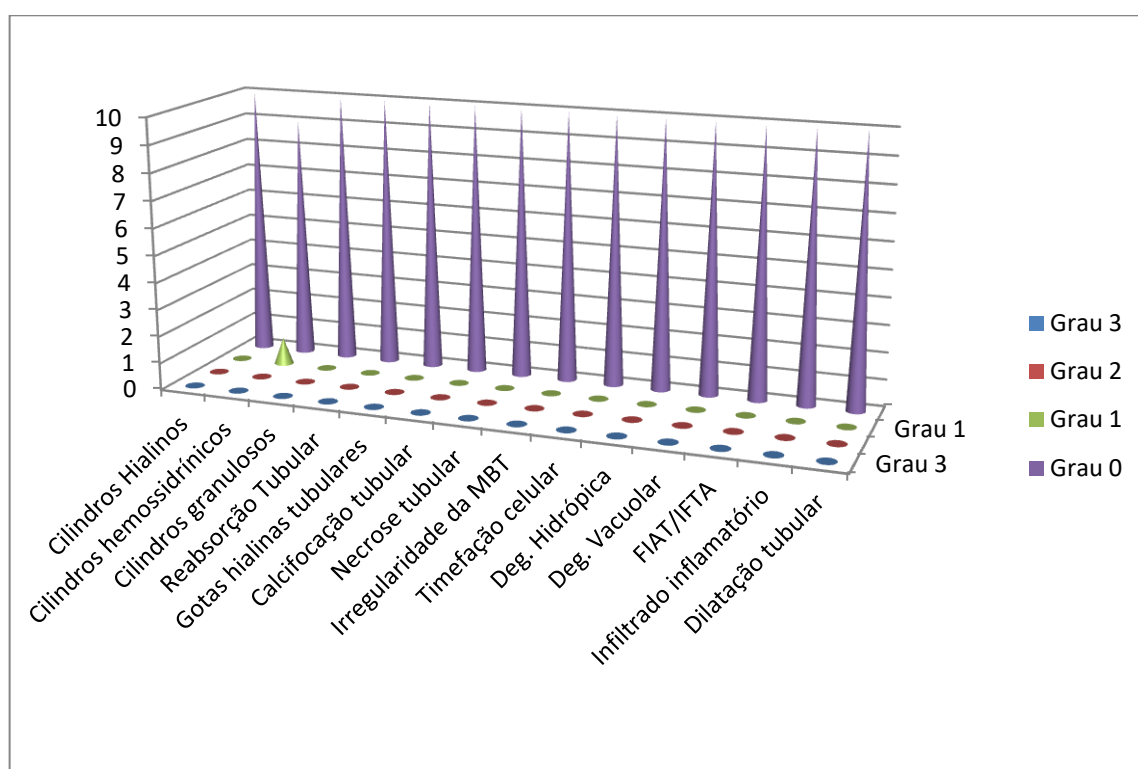
Relativamente às lesões glomerulares estudadas nos grupos de animais anémicos 3c, verificou-se que a hiper celularidade estava presente em 80% (n=4) dos animais, com grau 1 para 60% (n=3) dos casos e grau 2 para 20% (n=1). Verificou-se ainda que nenhum animal apresentava as restantes leões em estudo, tendo sido atribuído o grau 0 para MBG, expansão mesangial, esclerose nodular, glomeruloesclerose global, hialinose pólo vascular glomerular, espessamento da cápsula de bowman e atrofia glomerular (n=5) (Figura 12).



**Figura 12.** Lesões glomerulares estudadas no grupo de animais anémicos G3c.

Relativamente às lesões tubulares estudadas nos grupos de animais controlo, verificou-se que a maioria dos animais não apresentava nenhuma das lesões em estudo, tendo sido atribuído o grau 0 para cilindros hialinos, cilindros granulados, reabsorção tubular, gotas hialinas tubulares, calcificação tubular, necrose tubular, irregularidade da MBT, tumefacção celular, Degenerescência hidrópica, degenerescência vacuolar, FIAT/IFTA, infiltrado inflamatório e dilatação tubular (n=10) (Figura 13).

Verificou-se também a presença de cilindros hemossiderínicos em 10% (n=1) dos animais, com grau 1 (Figura 13).



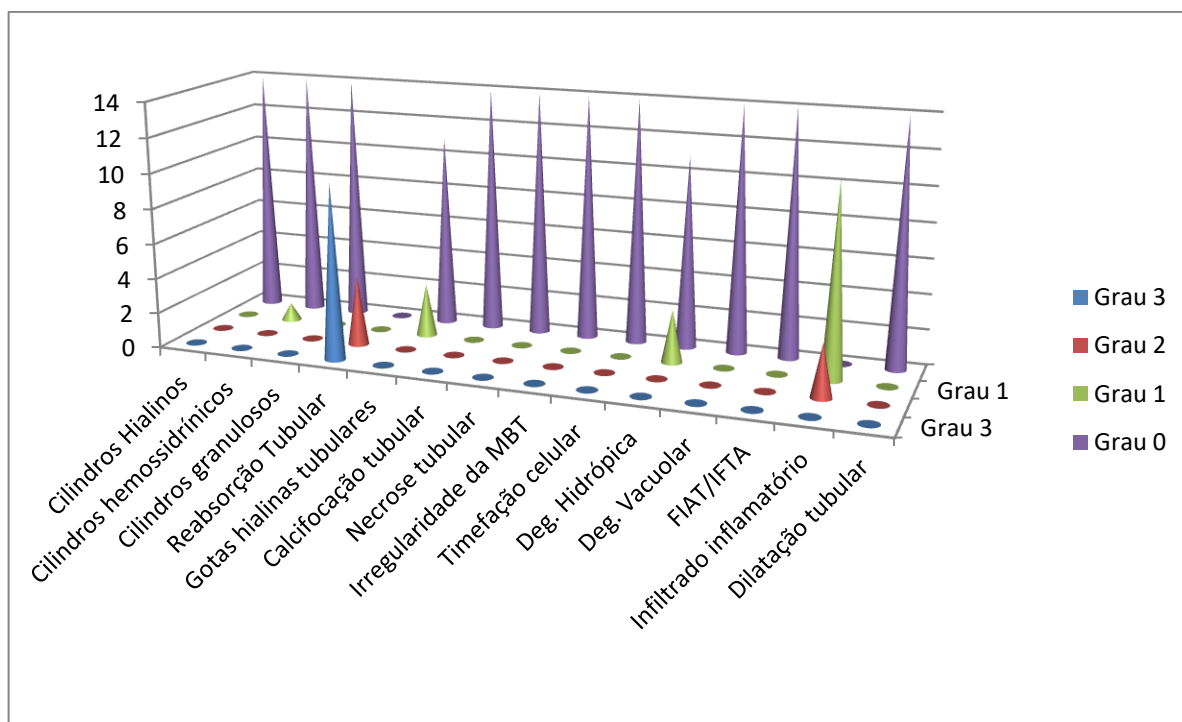
**Figura 13.** Lesões tubulares estudadas no grupo de animais controlo.

Relativamente às lesões tubulares estudadas nos grupos de animais anémicos, verificou-se que cilindros hialinos, cilindros hemossidrínicos, cilindros granulados, calcificação tubular, necrose tubular, irregularidade da MBT, tumefacção celular, degenerescência vacuolar, FIAT/IFTA e dilatação tubular não estavam presentes, tendo sido atribuído o grau 0 a 100% (n=14) dos animais em estudo (Figura 14).

Por outro lado, verificou-se a presença de reabsorção tubular em 100% (n=14) dos casos, com diferentes graus, tendo sido atribuído grau 2 a, aproximadamente, 29% (n=4) e grau 3 a, aproximadamente, 71% (n=10) (Figura 14).

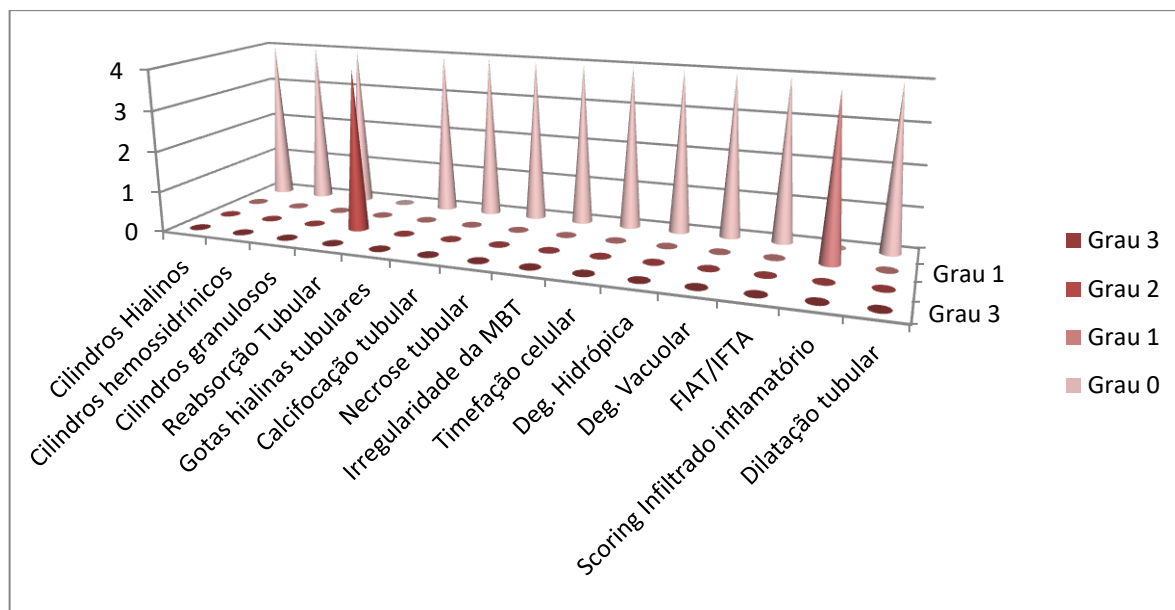
Verificou-se ainda a presença de gotas hialinas tubulares em cerca de 21% (n=3) dos casos, de grau 1, bem como, cerca de 21% (n=3) de degenerescência hidrópica de grau 1 (Figura 14).

Todos os animais deste grupo (100%) apresentaram Infiltrado inflamatório, tendo sido atribuído o grau 1 a 79% e o grau 2 a 21%, aproximadamente (Figura 14).



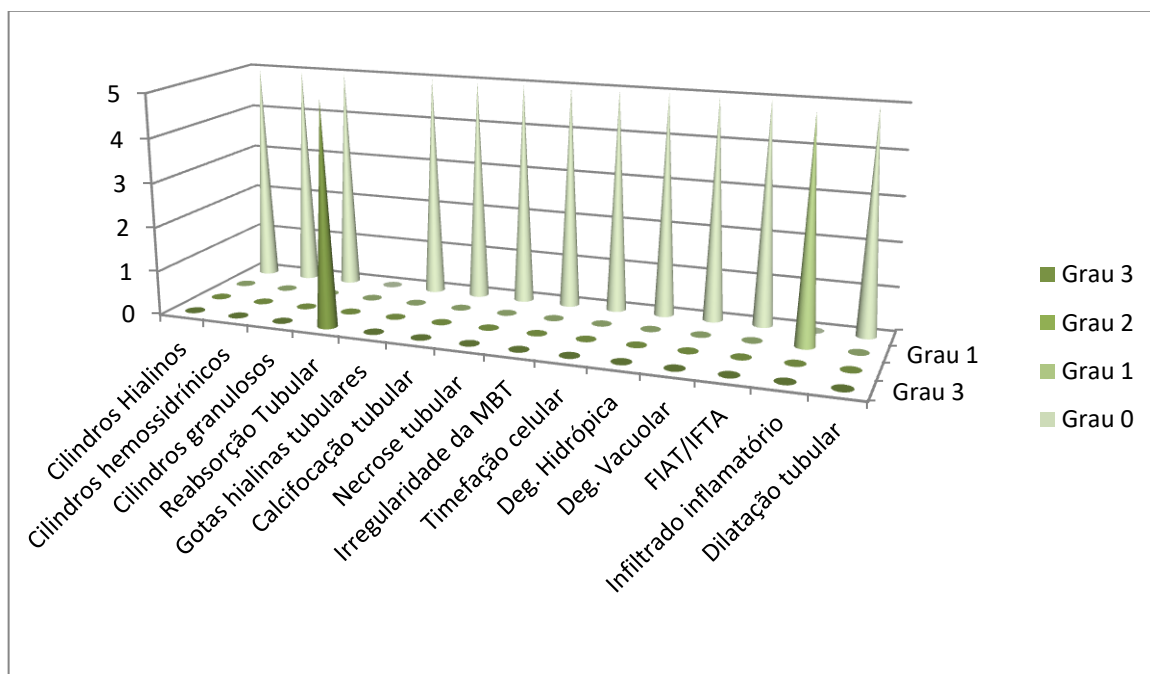
**Figura 14.** Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anêmicos.

Relativamente às lesões tubulares estudadas nos grupos de animais anêmicos 3a, verificou-se apenas a presença de duas lesões, nomeadamente reabsorção tubular (n=4; 100%) e infiltrado inflamatório (n=4; 100%), tendo sido atribuído o grau 2 à primeira e o grau 1 à segunda a todos os animais (Figura 15).



**Figura 15.** Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anêmicos G3a.

Relativamente às lesões tubulares estudadas nos grupos de animais anêmicos 3b, verificou-se também a presença de reabsorção tubular (n=5; 100%) e infiltrado inflamatório (n=5; 100%), tendo sido atribuído o grau 3 à primeira e o grau 1 à segunda a todos os animais (Figura 16).



**Figura 16.** Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anêmicos G3b.

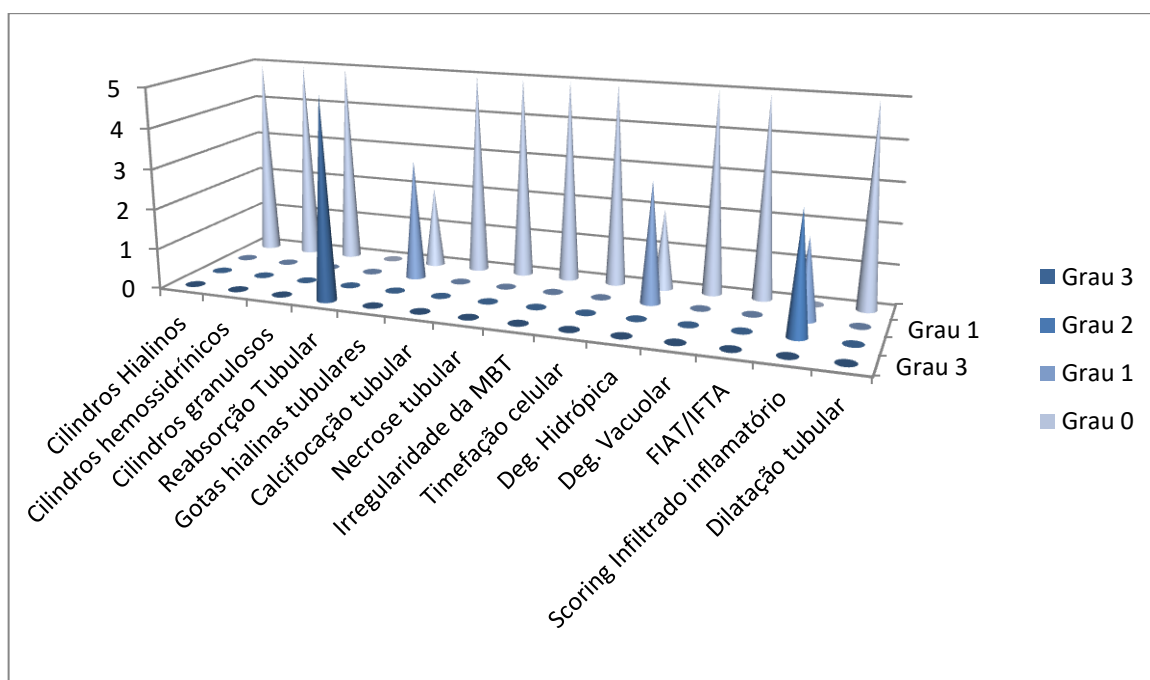
Relativamente às lesões tubulares estudadas nos grupos de animais anêmicos 3c, verificou-se a presença de quatro lesões distintas, nomeadamente reabsorção tubular (n=5; 100%), gotas hialinas tubulares (n=3; 60%), degenerescência hidrópica (n=3; 60%) e infiltrado inflamatório (n=5; 100%), tendo sido atribuídos diferentes graus (Figura 15).

Para a reabsorção tubular, verificou-se que todos os animais apresentavam grau 3 (Figura 15).

Para as gotas hialinas tubulares, verificou-se grau 1 em todos os animais que apresentavam a lesão (Figura 15).

Para a degenerescência hidrópica, todos os animais que apresentavam a lesão tinham grau 1 (Figura 15).

Para o infiltrado inflamatório, 40% (n=2) dos animais foram classificados com grau 1 e 60% (n=3) com grau 2 (Figura 15).

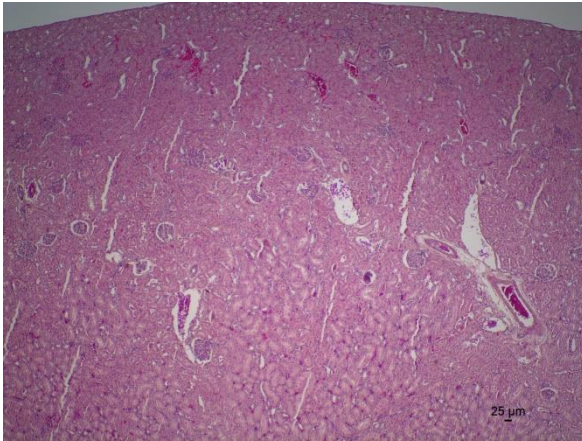


**Figura 17.** Lesões tubulares estudadas no grupo de animais anêmicos G3c.

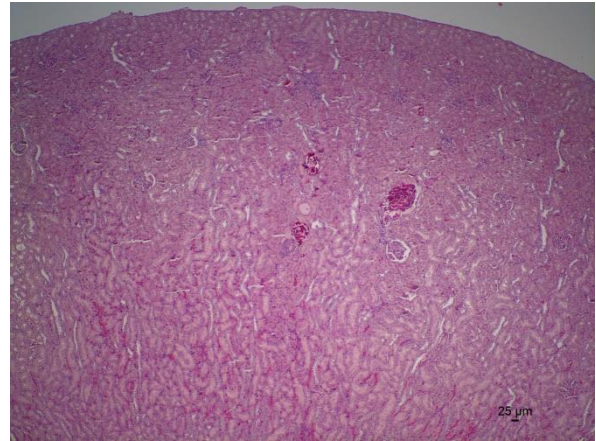


### 3.2.1. ICONOGRAFIA

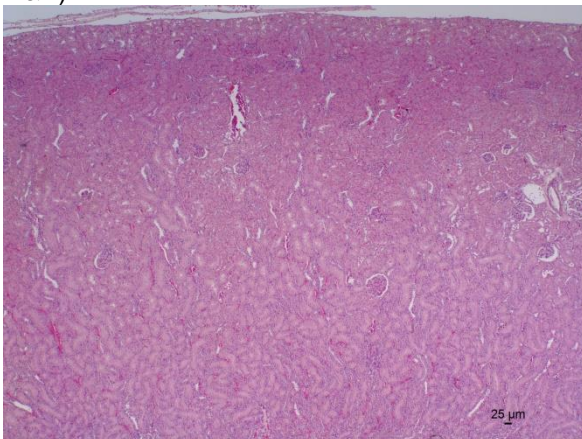
#### 3.2.1.1. GRUPO DE ANIMAIS CONTROLO



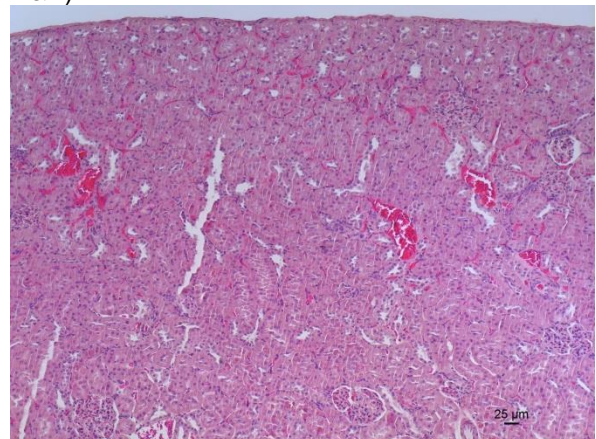
**Figura 18.** Rato W28 (G1). Córtex renal normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 (4x H&E).



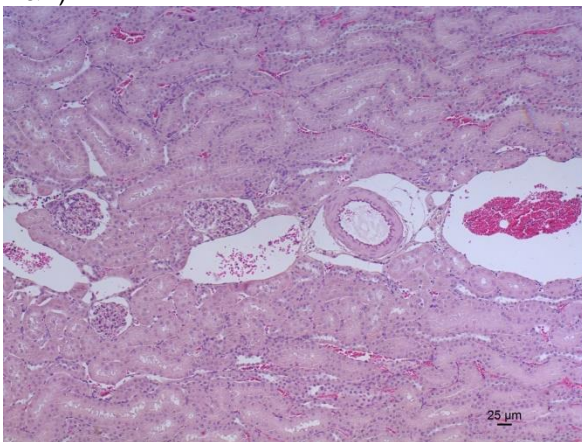
**Figura 19.** Rato W14 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (4x H&E).



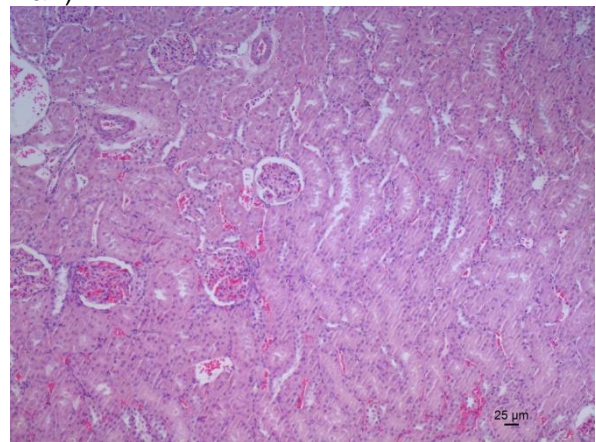
**Figura 20.** Rato W21 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (4x H&E).



**Figura 21.** Rato W28 (G1). Córtex renal normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 (10x H&E).

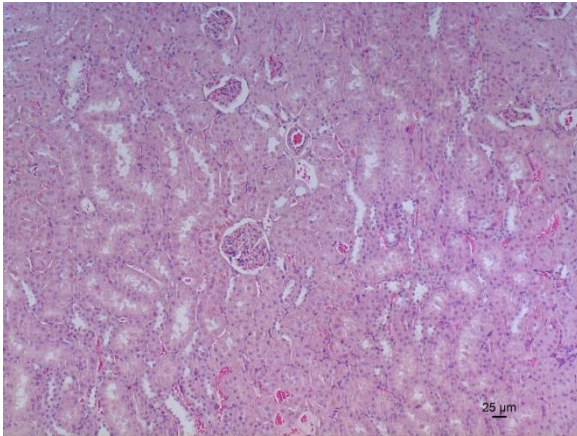


**Figura 22.** Rato W1 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 0 e hiperémia de grau 0 (10x H&E).

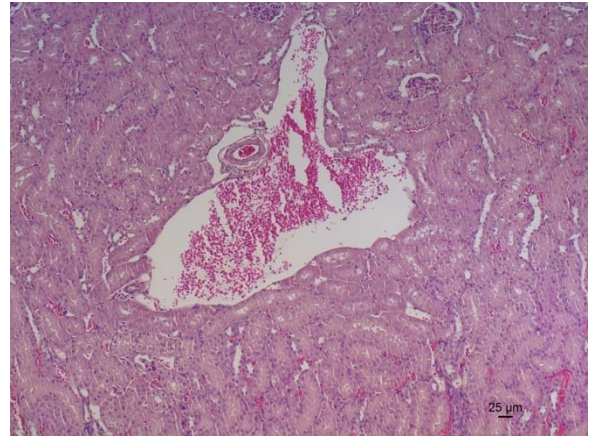


**Figura 23.** Rato W25 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (10x H&E).

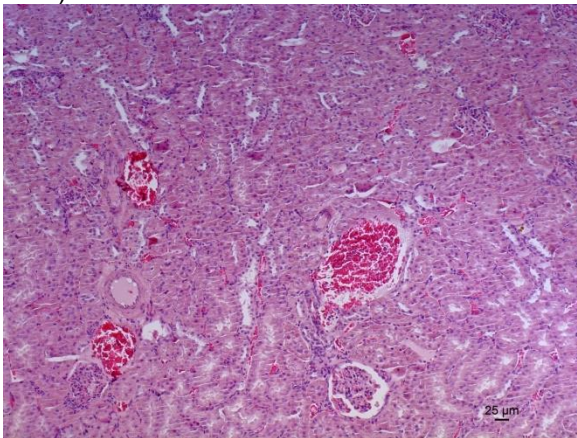




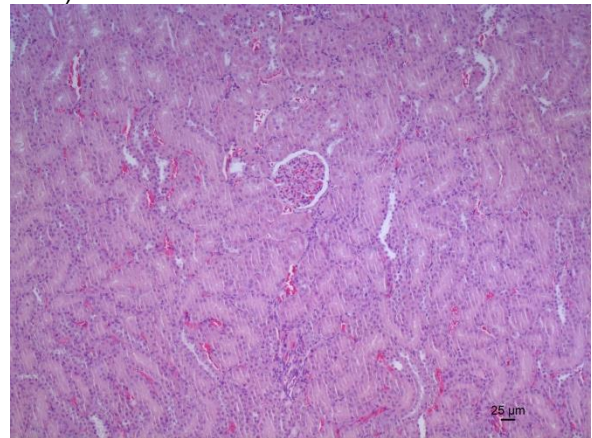
**Figura 24.** Rato W3 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 2 e hiperemia de grau 1 (10x H&E).



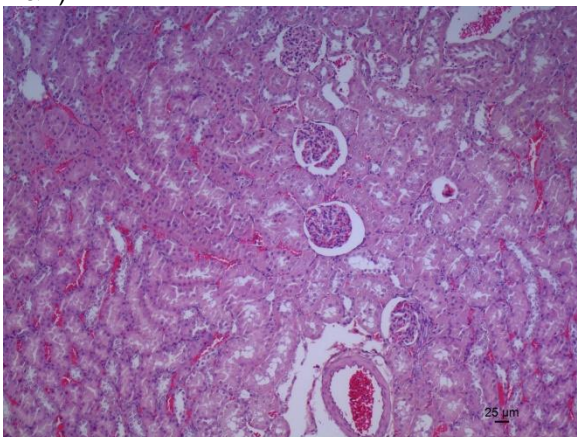
**Figura 25.** Rato W10 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperemia de grau 1 (10x H&E).



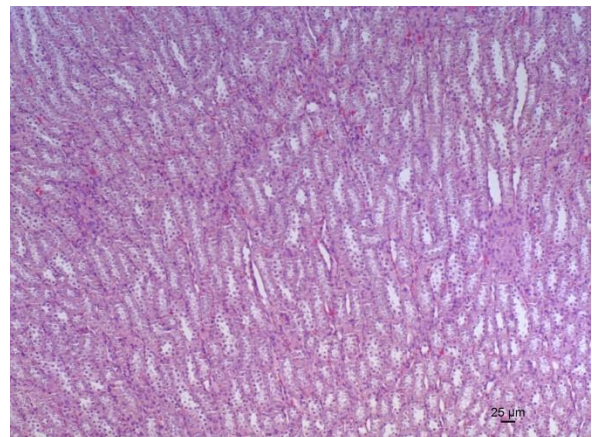
**Figura 26.** Rato W14 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 e hiperemia de grau 1 (10x H&E).



**Figura 27.** Rato W21 (G2). Córtex renal normal, congestão de grau 1 (10x H&E).

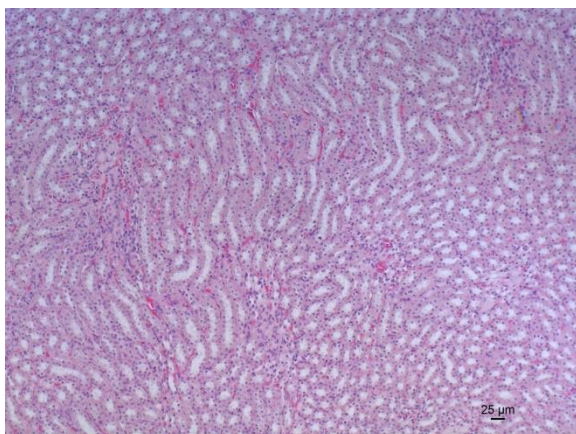


**Figura 28.** Rato W22 (G1). Glomérulos normais, congestão de grau 1 e hiperemia de grau 1 (10x H&E).

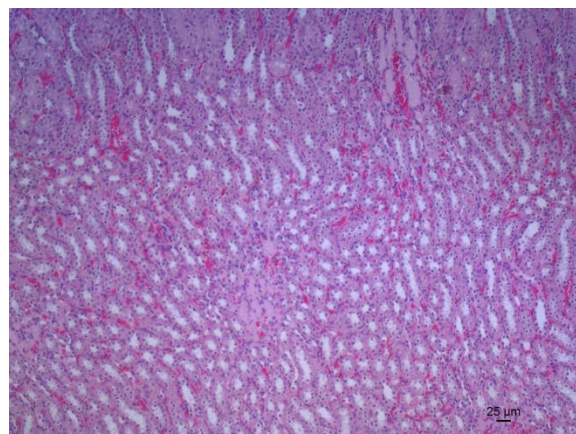


**Figura 29.** Rato W14 (G2). Medular normal, congestão de grau 0 (10x H&E).

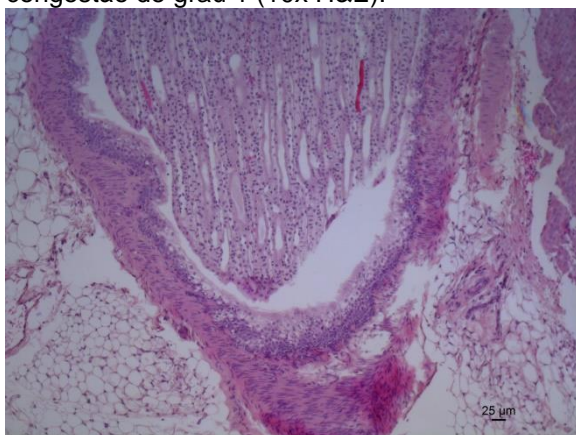




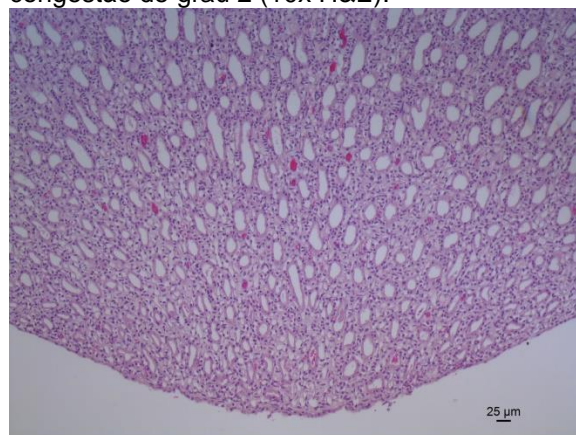
**Figura 30.** Rato W1 (G2). Medular normal, congestão de grau 1 (10x H&E).



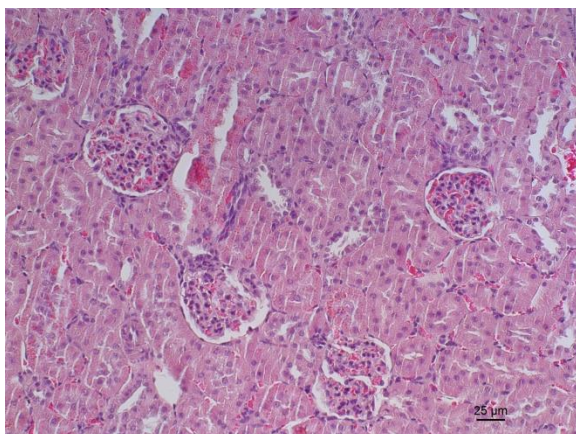
**Figura 31.** Rato W27 (G1). Medular normal, congestão de grau 2 (10x H&E).



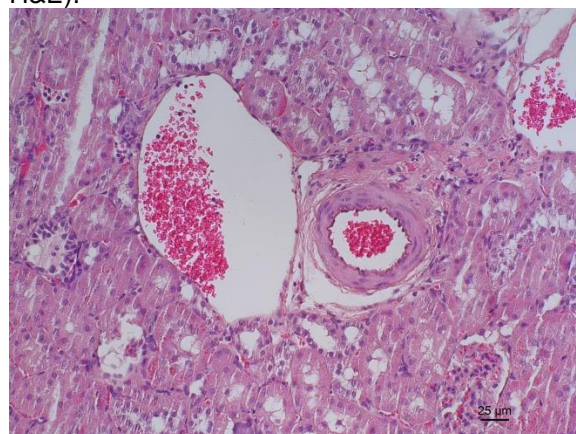
**Figura 32.** Rato W26 (G1). Pélvis normal (10x H&E).



**Figura 33.** Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossidderínicos de grau 1 (10x H&E).

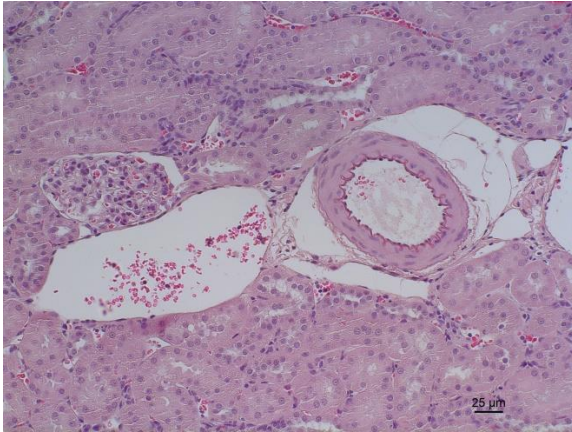


**Figura 34.** Rato W28 (G1). Côtex normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 (20x H&E).

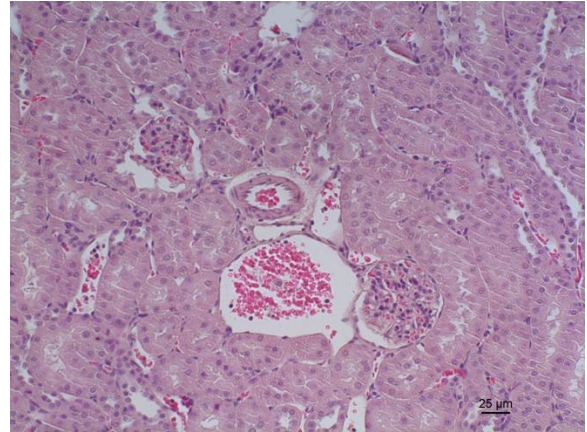


**Figura 35.** Rato W28 (G1). Côtex normal, congestão de grau 2 e hiperémia de grau 1 (20x H&E).

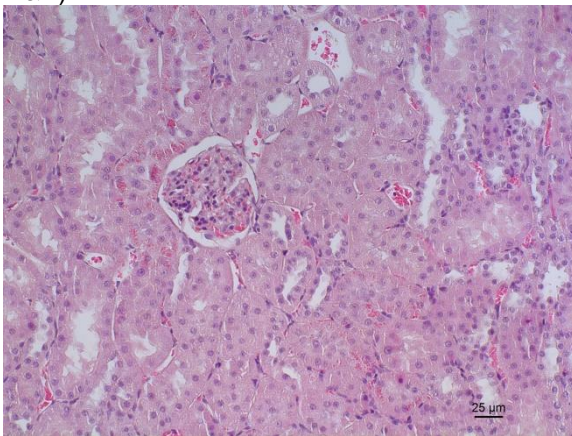




**Figura 36.** Rato W1 (G2). C rtex normal, congest o de grau 0 e hiper mia de grau 0 (20x H&E).



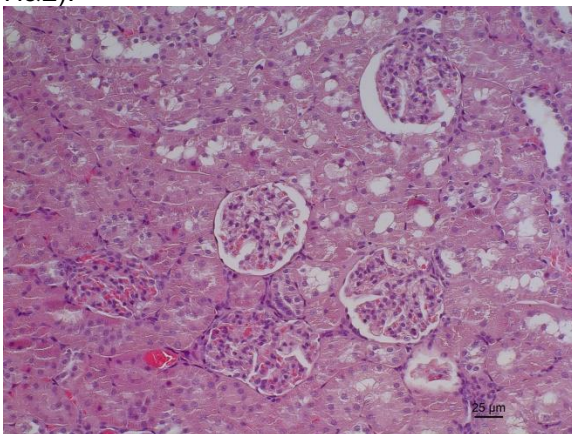
**Figura 37.** Rato W1 (G2). C rtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (20x H&E).



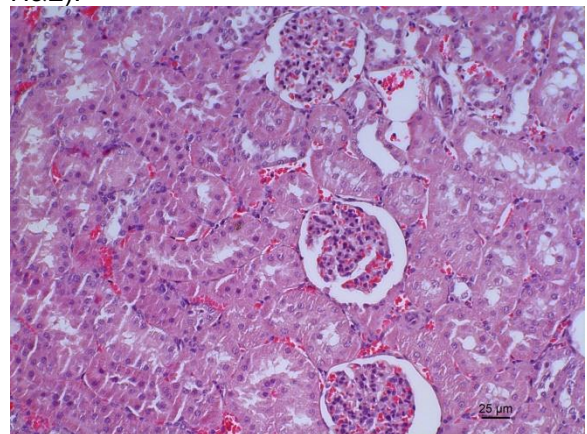
**Figura 38.** Rato W3 (G2). C rtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (20x H&E).



**Figura 39.** Rato W10 (G2). C rtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (20x H&E).

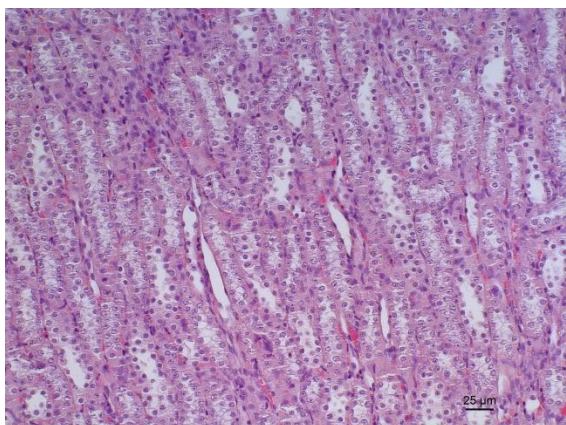


**Figura 40.** Rato W14 (G2). Glomérulos normais, congestão de grau 1 (20x H&E).

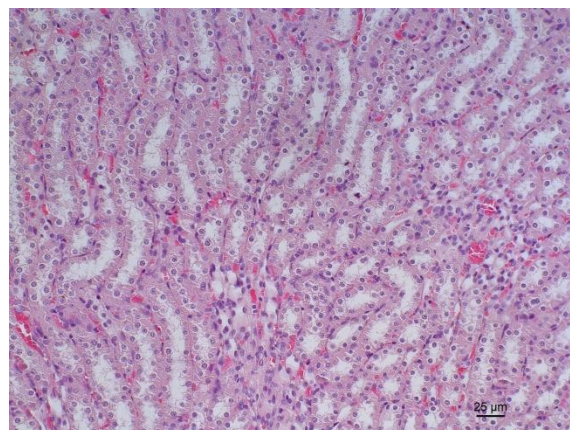


**Figura 41.** Rato W28 (G1). Glomérulos normais, congestão de grau 2 (20x H&E).

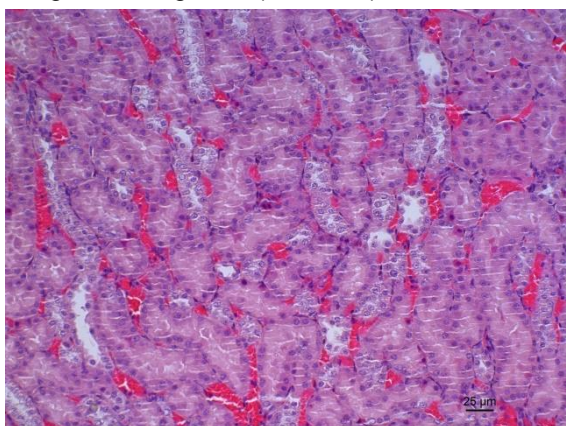




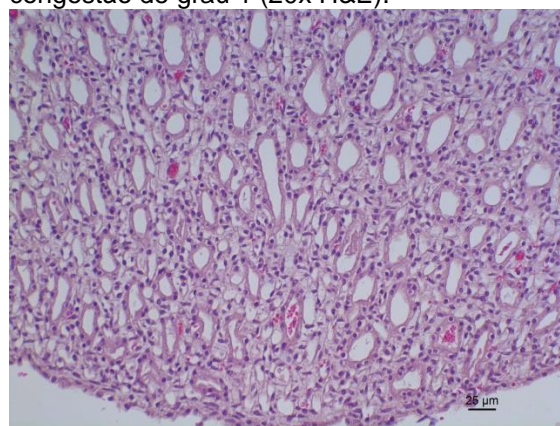
**Figura 42.** Rato W14 (G2). Medular normal, congestão de grau 0 (20x H&E).



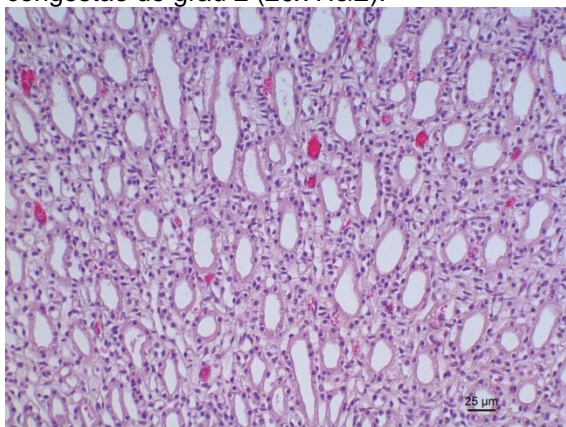
**Figura 43.** Rato W1 (G2). Medular normal, congestão de grau 1 (20x H&E).



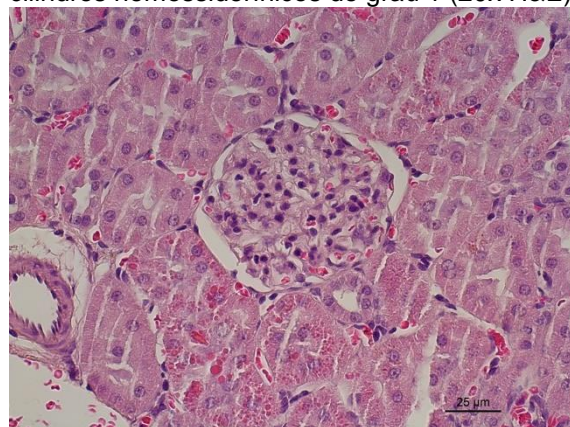
**Figura 44.** Rato W22 (G1). Medular normal, congestão de grau 2 (20x H&E).



**Figura 45.** Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossiderínicos de grau 1 (20x H&E).

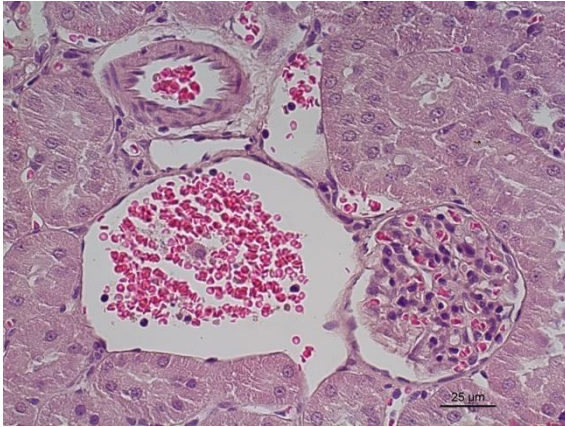


**Figura 46.** Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossiderínicos de grau 1 (20x H&E).



**Figura 47.** Rato W28 (G1). Córtex normal, congestão de grau 2 (40x H&E).

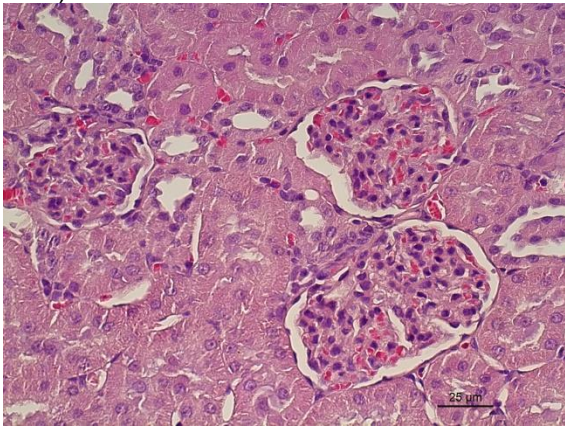




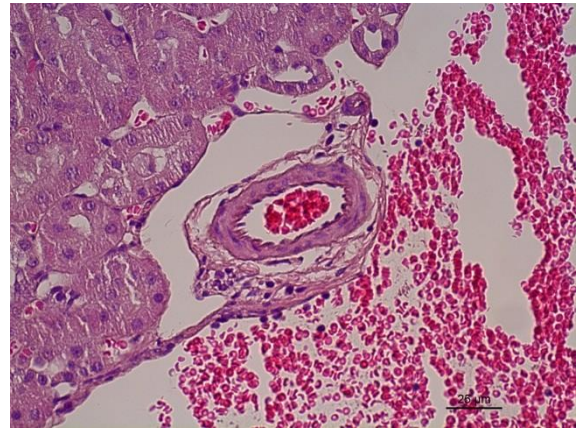
**Figura 48.** Rato W1 (G2). Córtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (40x H&E).



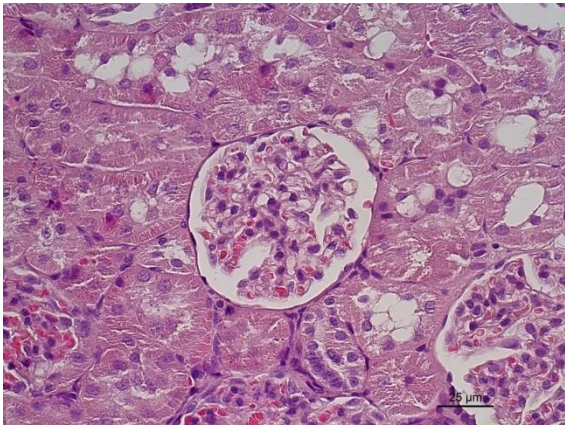
**Figura 49.** Rato W1 (G2). Córtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 0 (40x H&E).



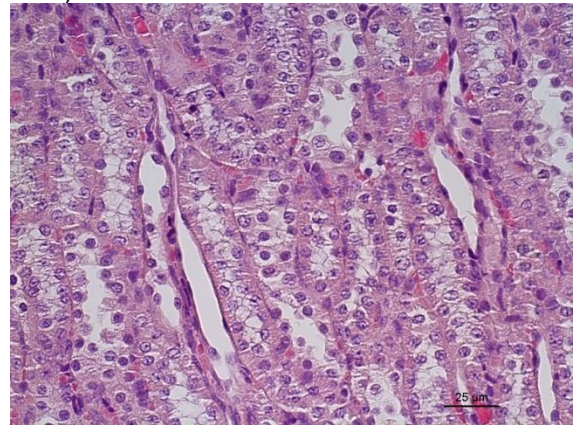
**Figura 50.** Rato W10 (G2). Córtex normal, congestão de grau 1 (40x H&E).



**Figura 51.** Rato W10 (G2). Córtex normal, congestão de grau 1 e hiperémia de grau 1 (40x H&E).



**Figura 52.** Rato W14 (G2). Glomérulos normais, congestão de grau 1 (40x H&E).

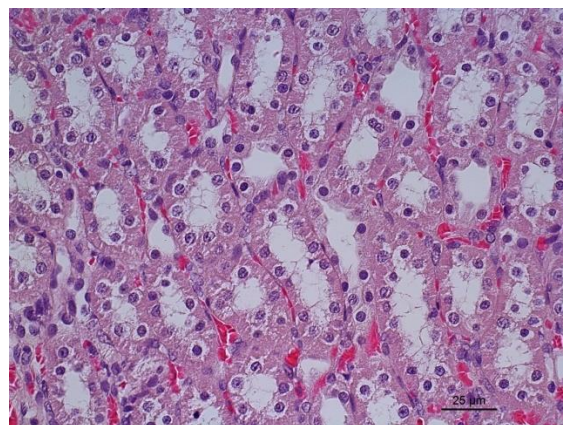


**Figura 53.** Rato W14 (G2). Medular normal, congestão de grau 0 (40x H&E).

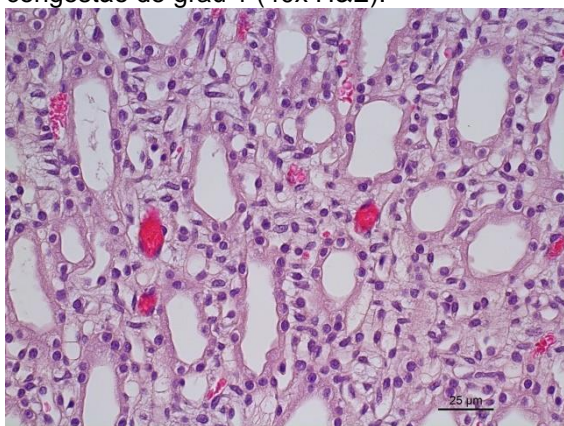




**Figura 54.** Rato W1 (G2). Medular normal, congestão de grau 1 (40x H&E).

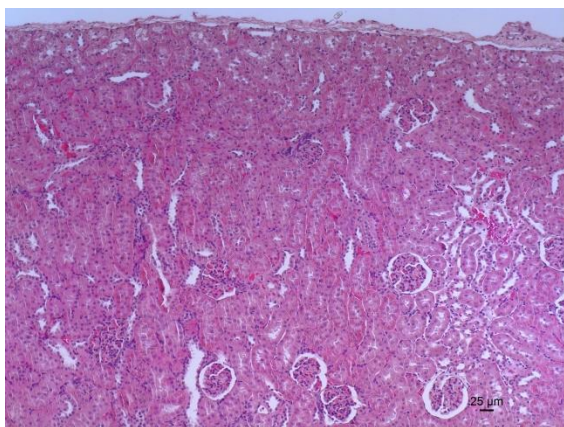


**Figura 55.** Rato W27 (G1). Medular normal, congestão de grau 2 (40x H&E).

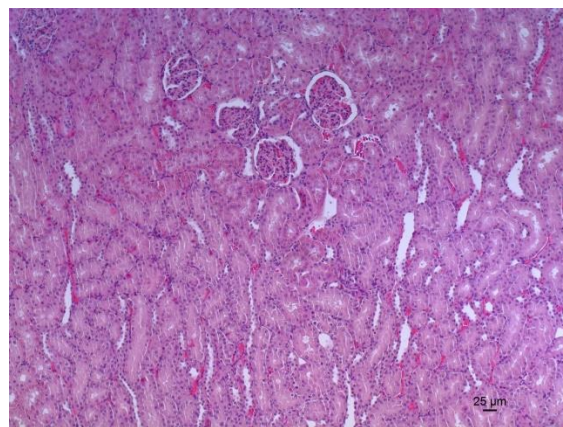


**Figura 56.** Rato W25 (G2). Papila normal, cilindros hemossiderínicos de grau 1 (40x H&E).

### 3.2.1.2. GRUPO DE ANIMAIS ANÊMICOS G3A

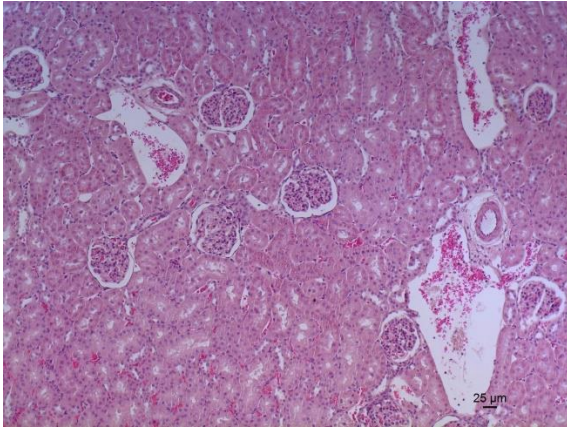


**Figura 57.** Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1 (10x H&E).

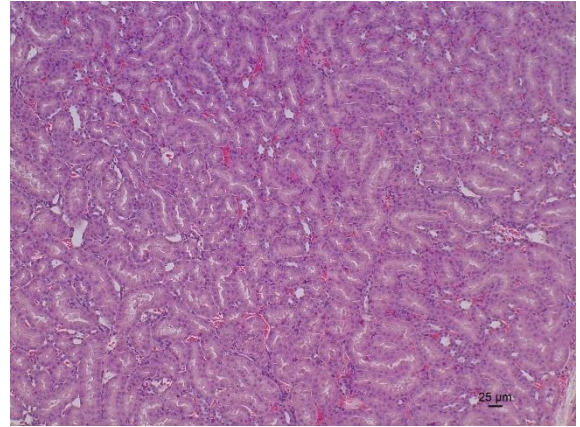


**Figura 58.** Rato W8 (G3A). Região Intercorticomedular (10x H&E).

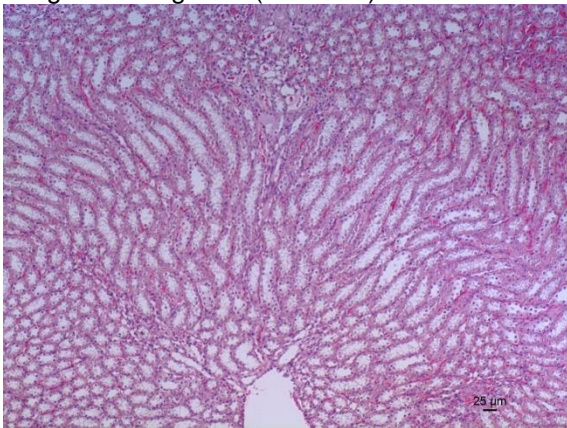




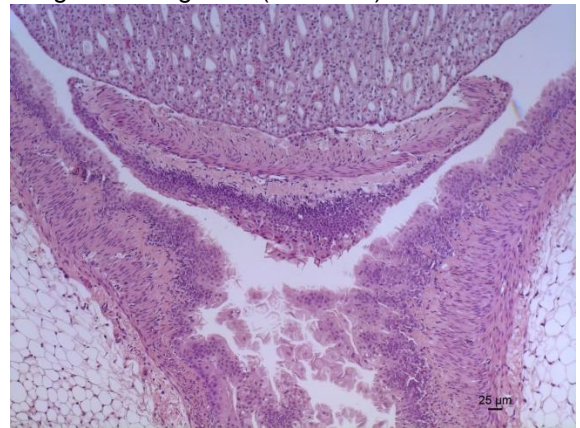
**Figura 59.** Rato W16 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2 (10x H&E).



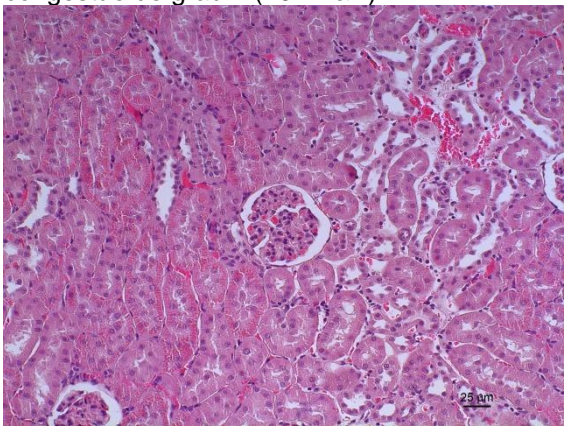
**Figura 60.** Rato W6 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1 (10x H&E).



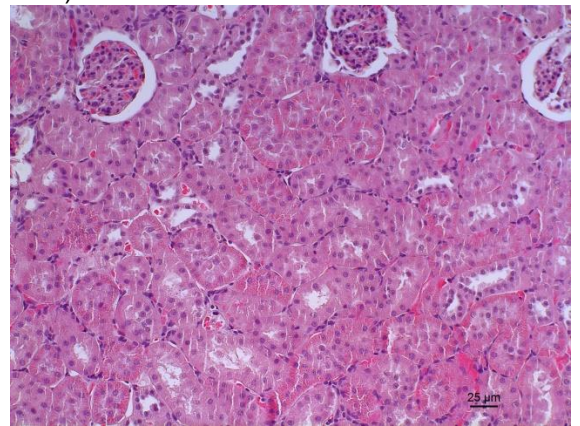
**Figura 61.** Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2 (10x H&E).



**Figura 62.** Rato W8 (G3A) Papila normal (10x H&E).

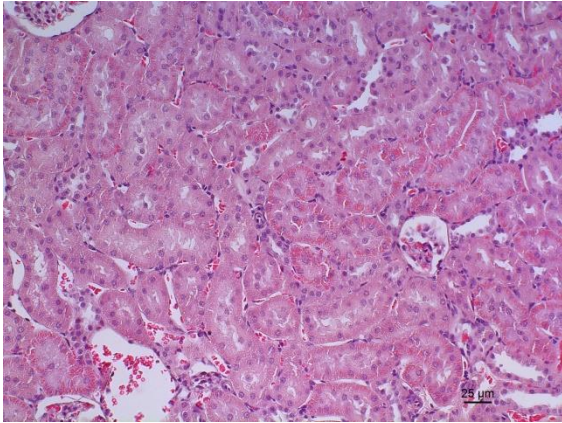


**Figura 63.** Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, reabsorção dos túbulos contornados proximais (20x H&E).

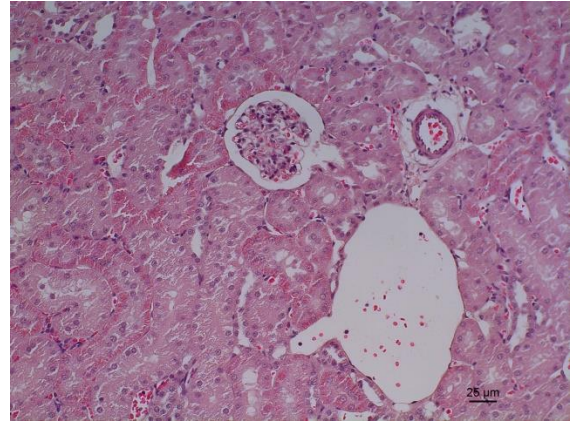


**Figura 64.** Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 (20x H&E).

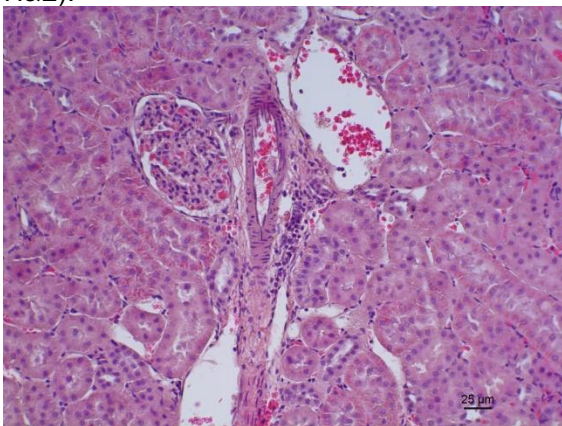




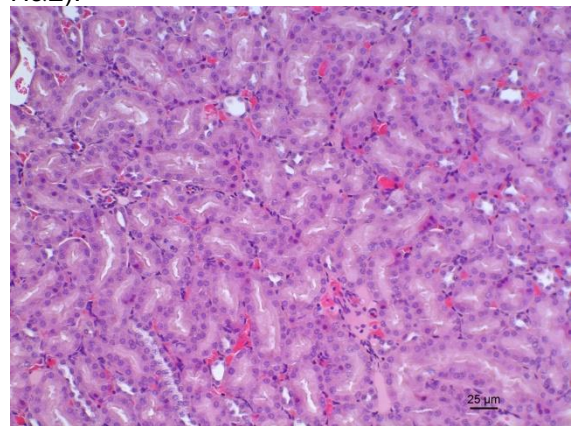
**Figura 65.** Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (20x H&E).



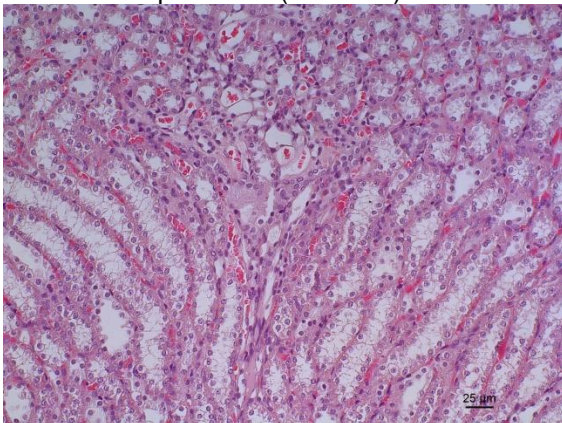
**Figura 66.** Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (20x H&E).



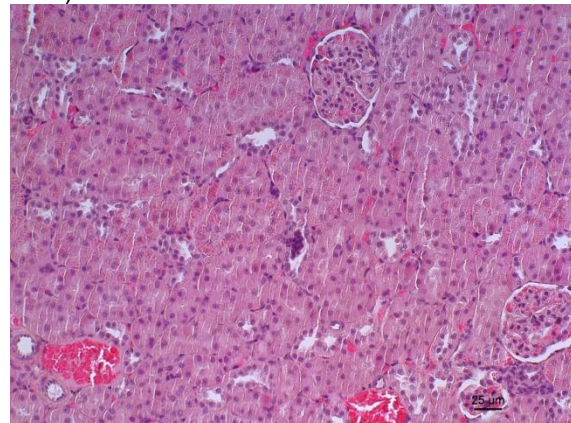
**Figura 67.** Rato W6 (G3A). Glomérulo com infiltrado inflamatório e reabsorção dos túbulos contornados proximais (20x H&E).



**Figura 68.** Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (20x H&E).

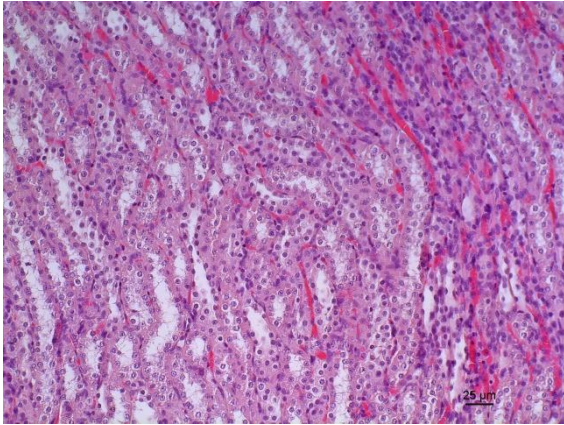


**Figura 69.** Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2 (20x H&E).

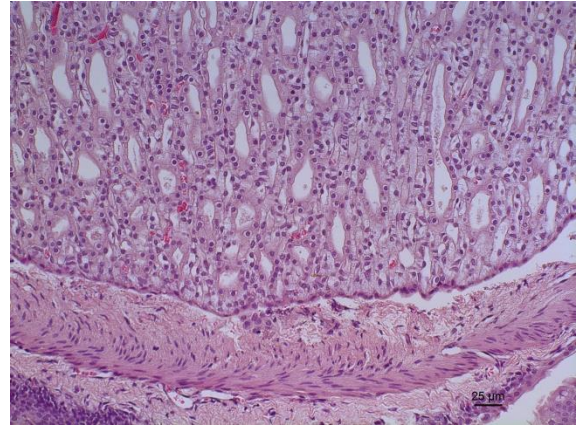


**Figura 70.** Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 (20x H&E).





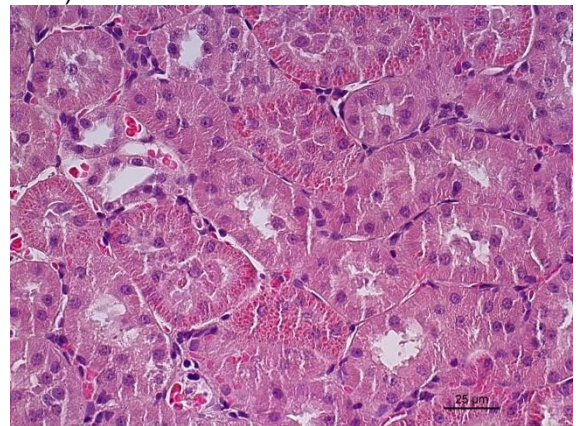
**Figura 71.** Rato W23 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1 (20x H&E).



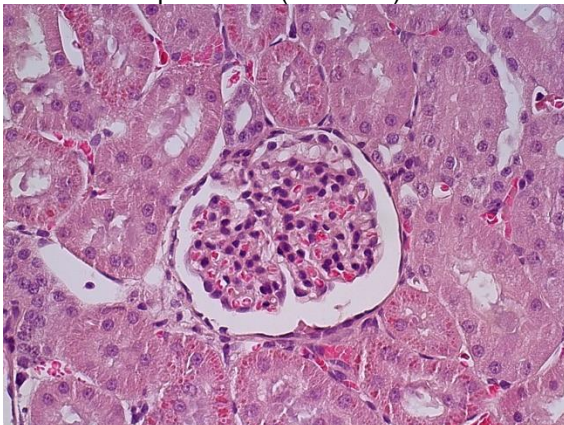
**Figura 72.** Rato W8 (G3A). Papila normal (20x H&E).



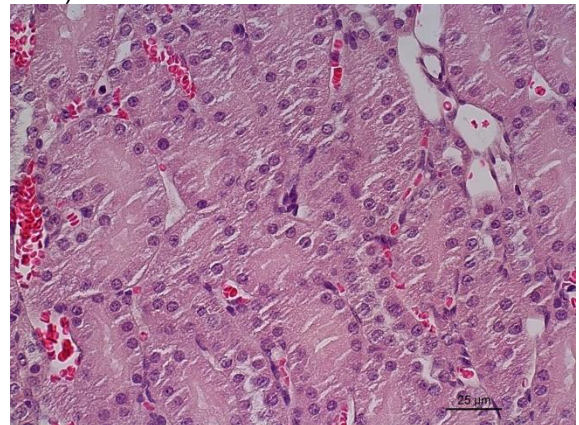
**Figura 73.** Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, reabsorção dos túbulos contornados proximais (40x H&E).



**Figura 74.** Rato W8 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 (40x H&E).

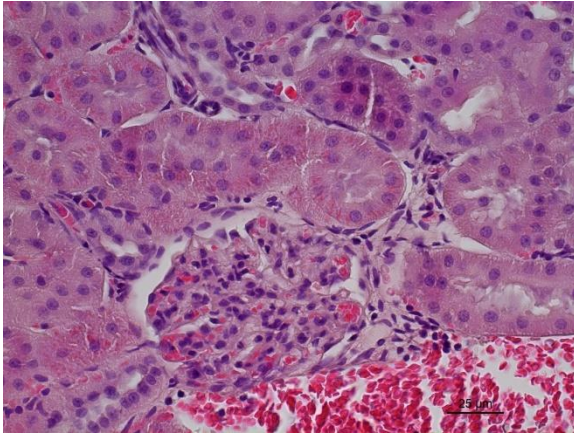


**Figura 75.** Rato W16 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 2 (40x H&E).

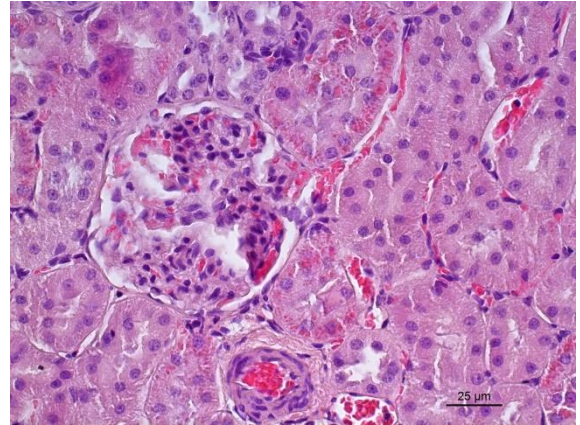


**Figura 76.** Rato W23 (G3A). Córtex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (40x H&E).

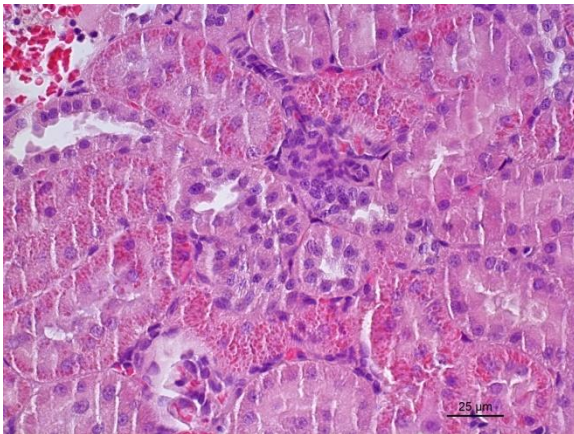




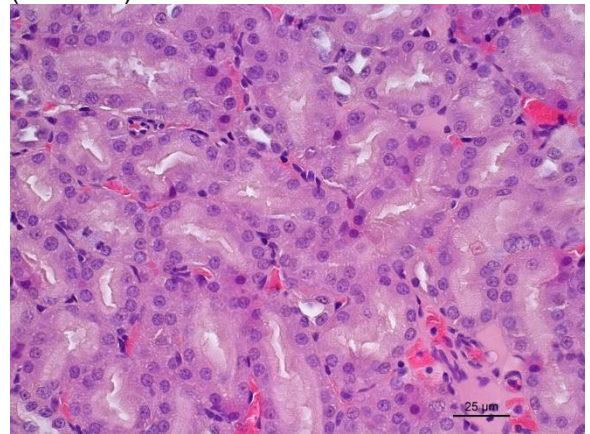
**Figura 77.** Rato W6 (G3A). Glomérulo com infiltrado inflamatório de grau 1 e reabsorção dos túbulos contornados proximais (40x H&E).



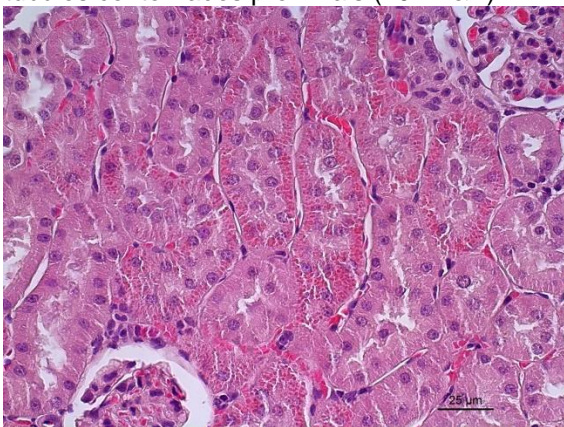
**Figura 78.** Rato W6 (G3A). Glomérulo e intertício com infiltrado inflamatório de grau 1 e reabsorção dos túbulos contornados proximais (40x H&E).



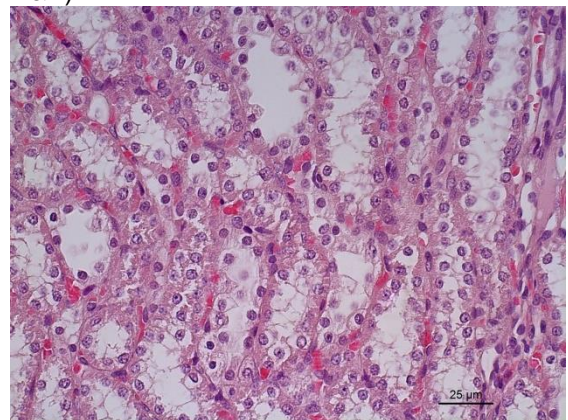
**Figura 79.** Rato W6 (G3A). Intertício com infiltrado inflamatório de grau 1 e reabsorção dos túbulos contornados proximais (40x H&E).



**Figura 80.** Rato W6 (G3A). Medular normal, congestão de grau 1 e inflamação de grau 1 (40x H&E).

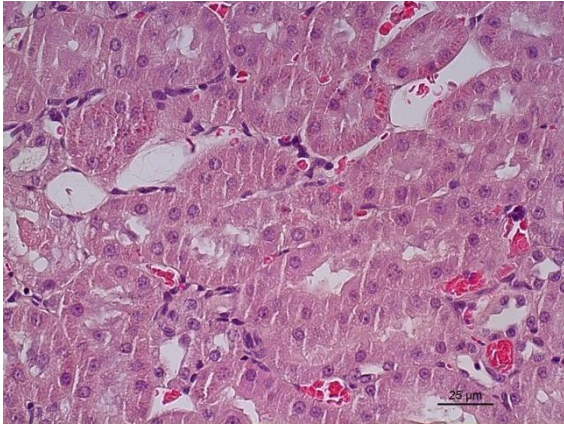


**Figura 81.** Rato W8 (G3A). Reabsorção dos túbulos contornados proximais (40x H&E).

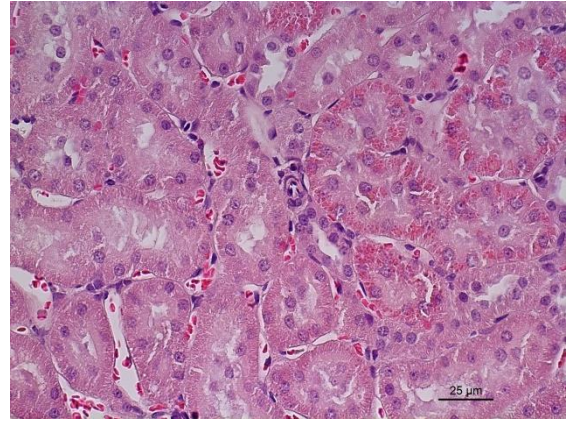


**Figura 82.** Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2 (40x H&E).

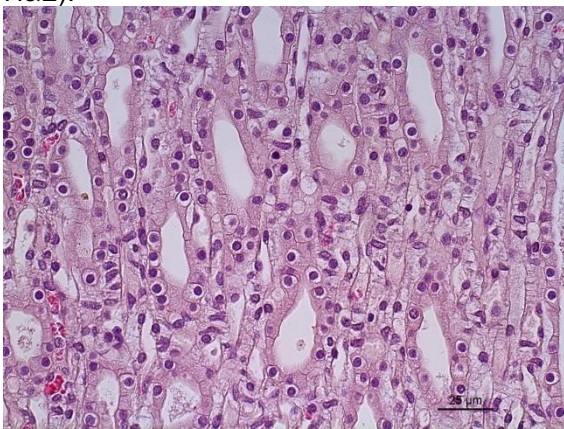




**Figura 83.** Rato W16 (G3A). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 (40x H&E).

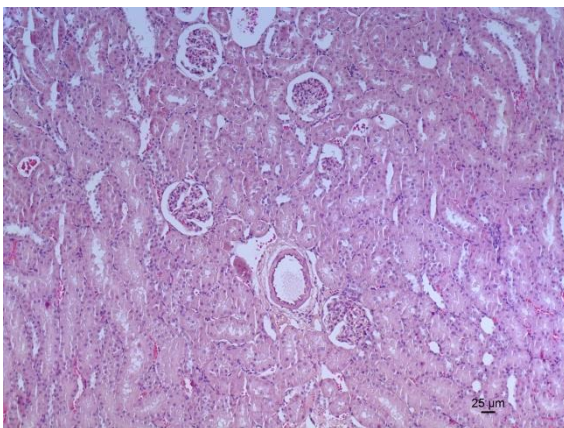


**Figura 84.** Rato W23 (G3A) Congestão de grau 1, inflamação de grau 1 e reabsorção de grau 3 (40x H&E).

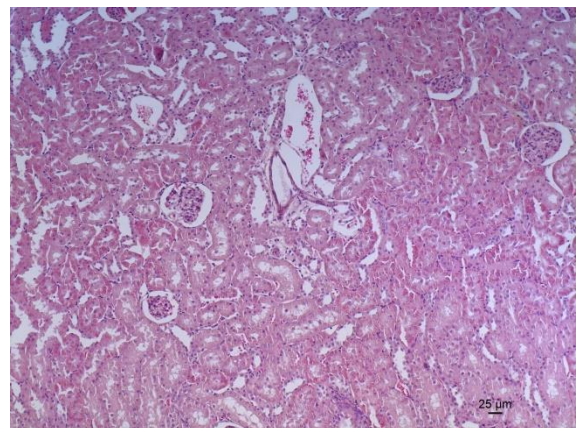


**Figura 85.** Rato W8 (G3A). Papila normal (40x H&E).

### 3.2.1.3. GRUPO DE ANIMAIS ANÊMICOS G3B

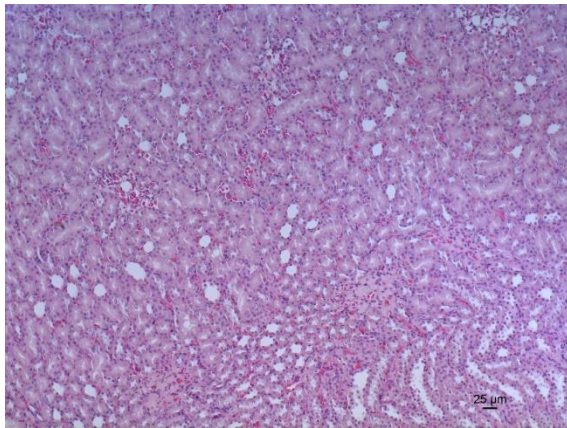


**Figura 86.** Rato W2 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 e reabsorção de grau 3 (10x H&E).

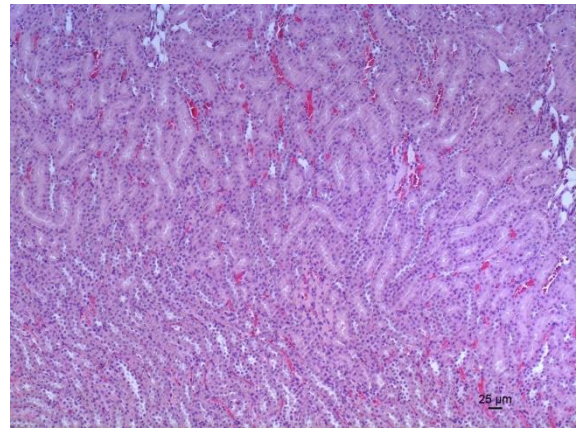


**Figura 87.** Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 e reabsorção de grau 3 (10x H&E).

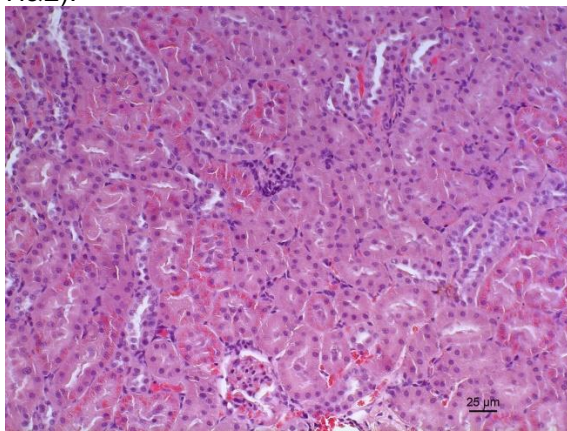




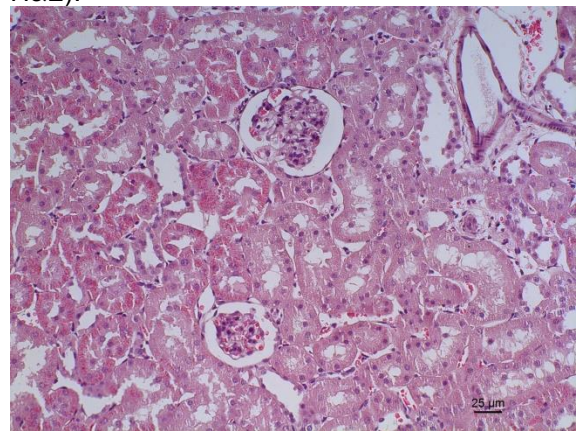
**Figura 88.** Rato W2 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (10x H&E).



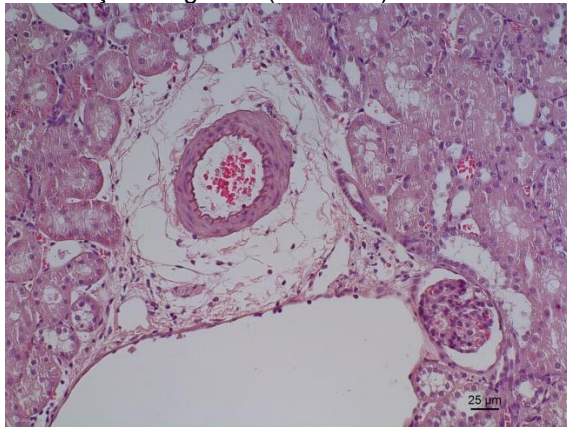
**Figura 89.** Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, infiltrado de grau 1 (10x H&E).



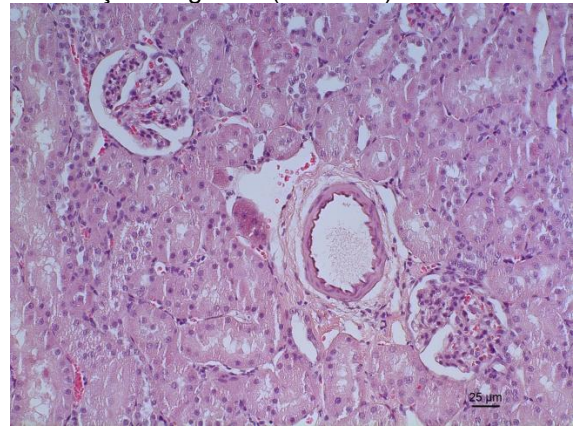
**Figura 90.** Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).



**Figura 91.** Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).

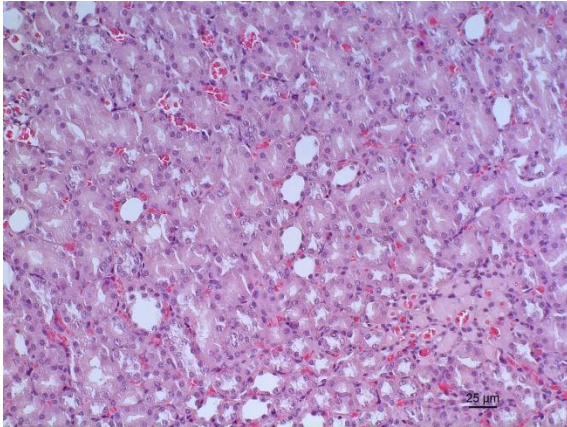


**Figura 92.** Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).

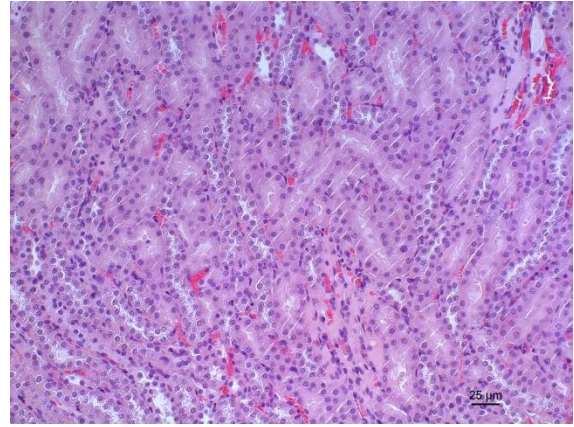


**Figura 93.** Rato W2 (G3B). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).

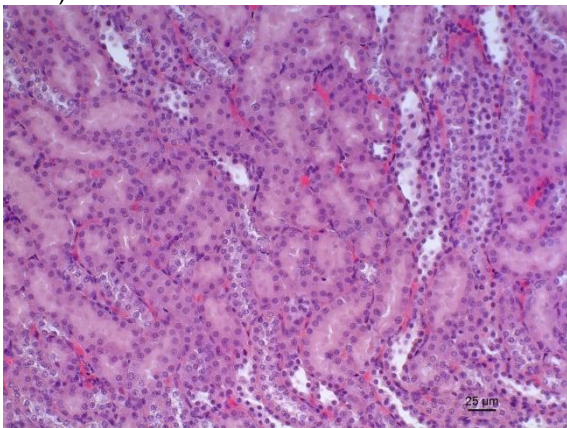




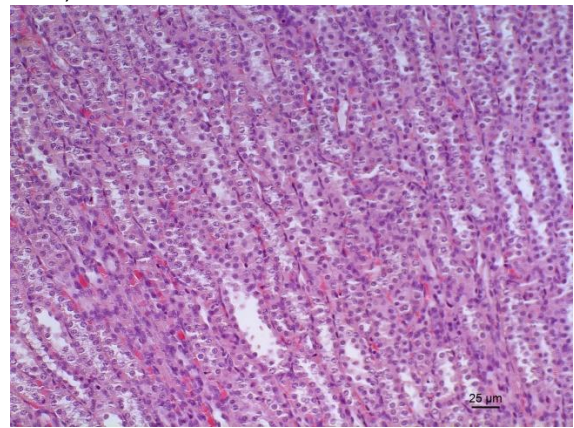
**Figura 94.** Rato W2 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (20x H&E).



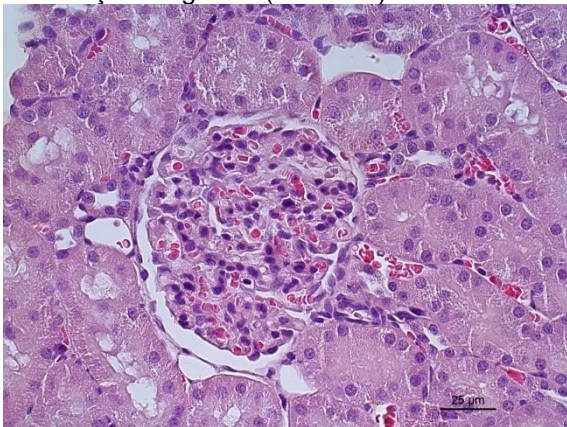
**Figura 95.** Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (20x H&E).



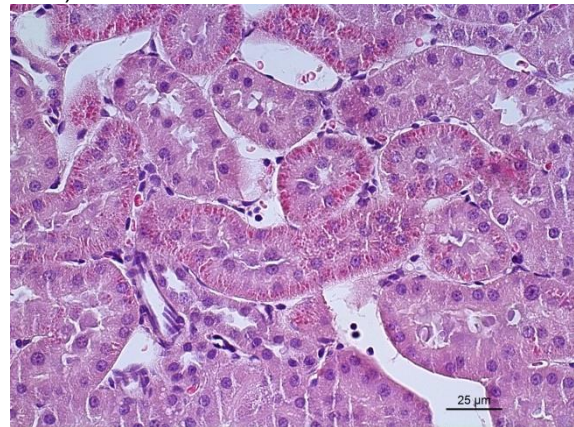
**Figura 96.** Rato W13 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).



**Figura 97.** Rato W18 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (20x H&E).

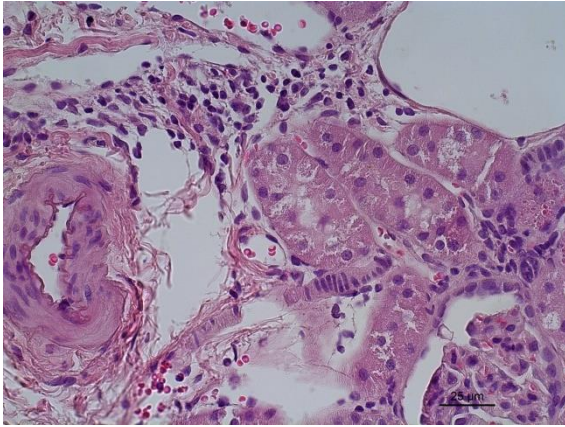


**Figura 98.** Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (40x H&E).

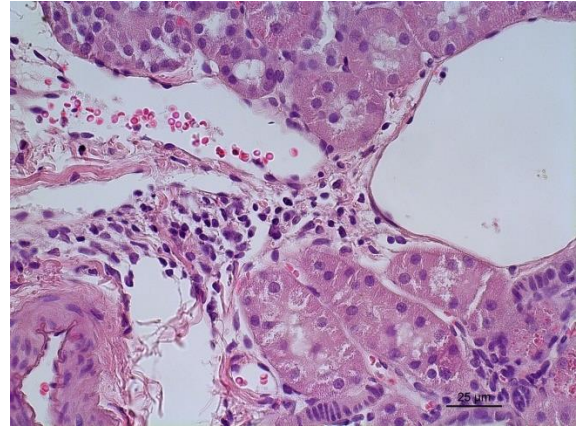


**Figura 99.** Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

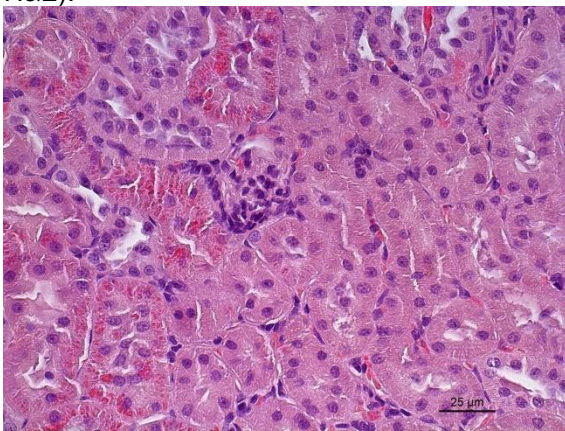




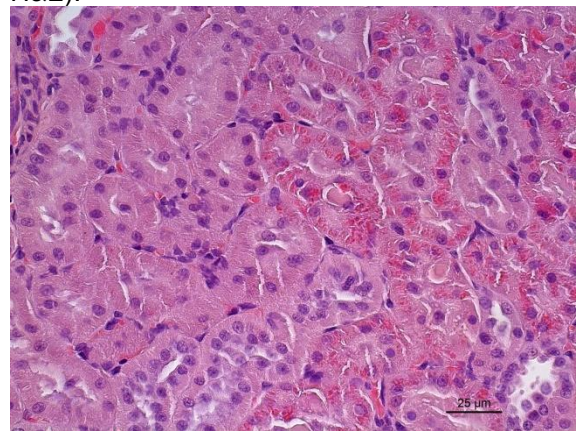
**Figura 100.** Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2 (40x H&E).



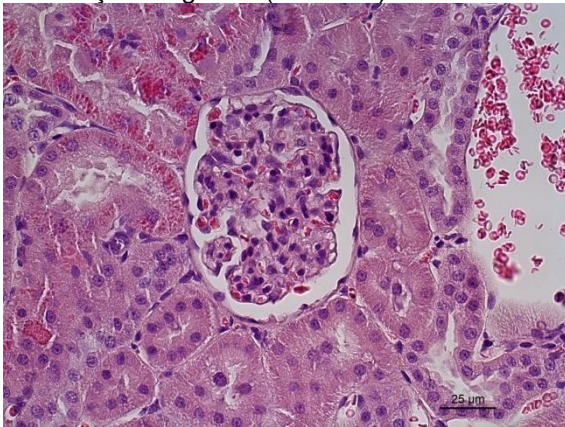
**Figura 101.** Rato W5 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2 (40x H&E).



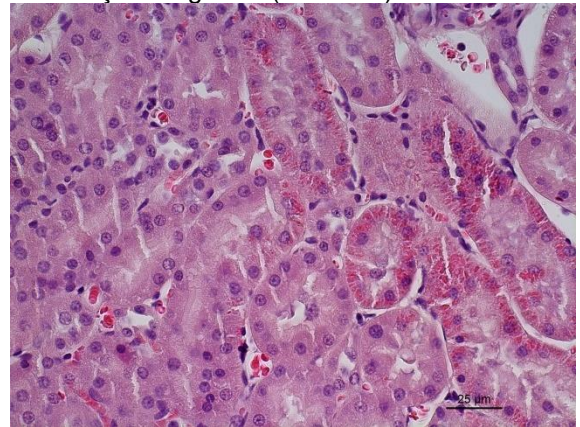
**Figura 102.** Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



**Figura 103.** Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

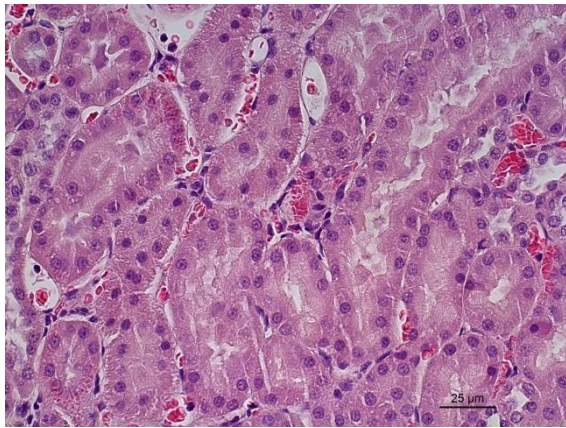


**Figura 104.** Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

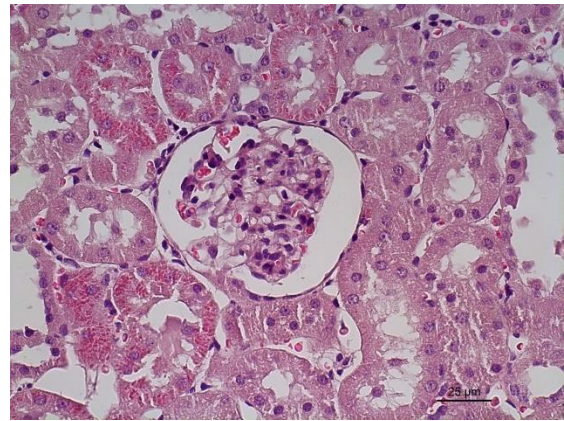


**Figura 105.** Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

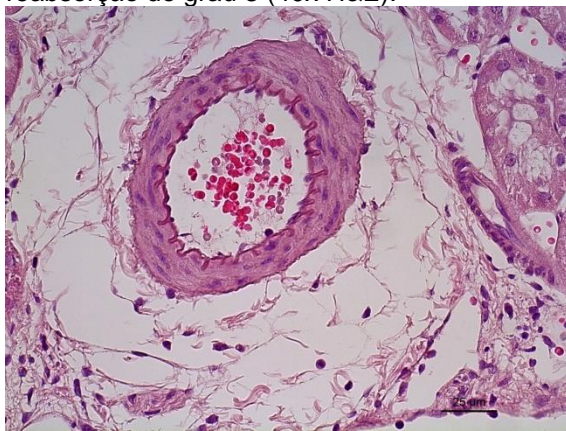




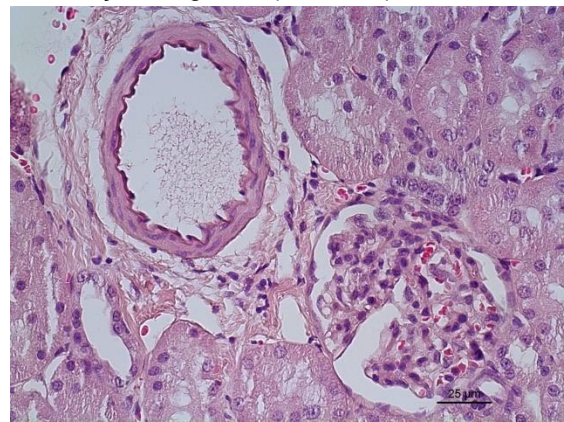
**Figura 106.** Rato W13 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



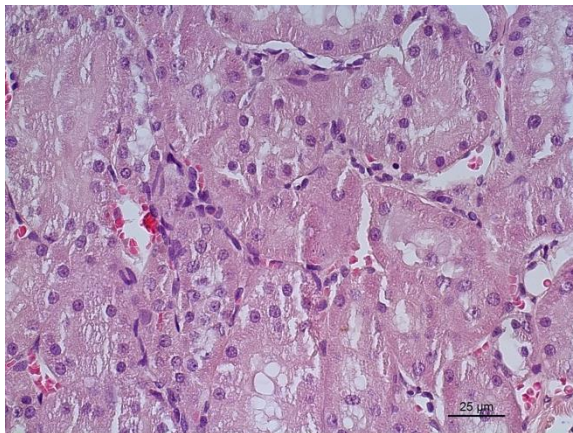
**Figura 107.** Rato W18 (G3B). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



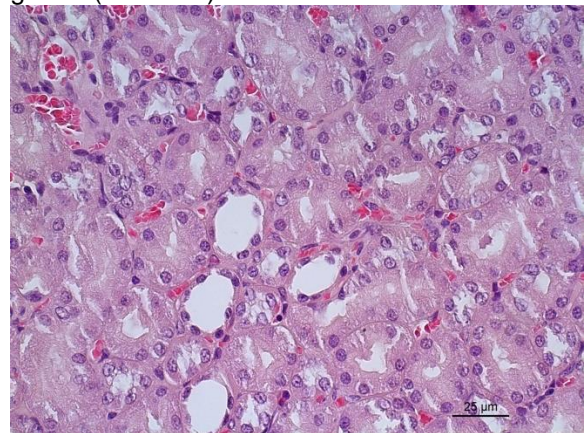
**Figura 108.** Rato W18 (G3B). Arteriola normal inflamação de grau 1 (40x H&E).



**Figura 109.** Rato W18 (G3B). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

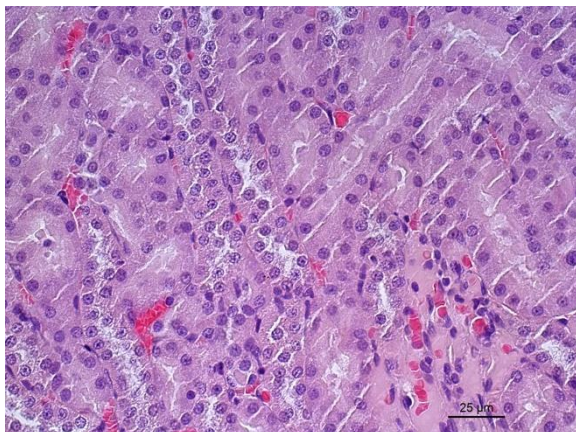


**Figura 110.** Rato W18 (G3B). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

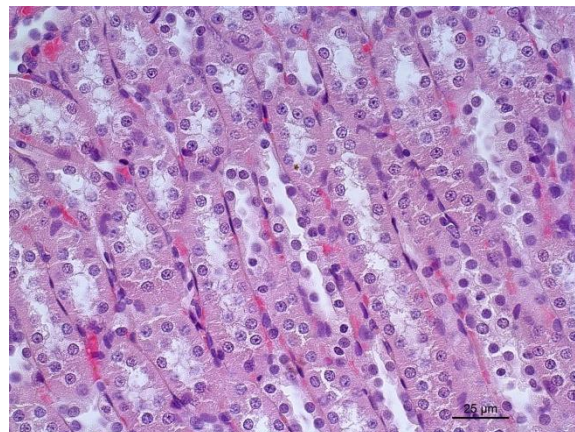


**Figura 111.** Rato W2 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (40x H&E).

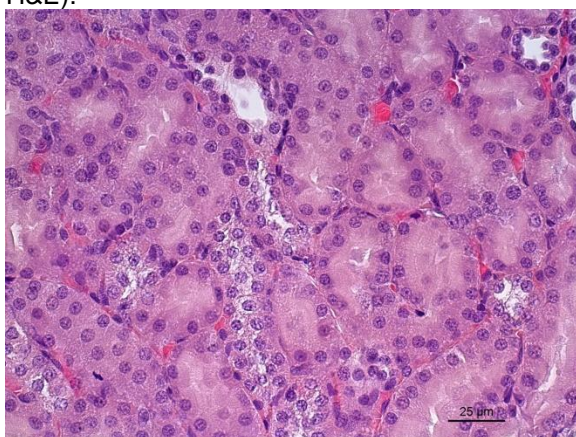




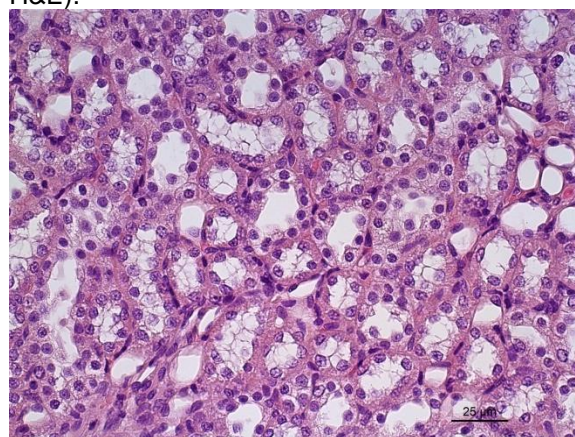
**Figura 112.** Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (40x H&E).



**Figura 113.** Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (40x H&E).



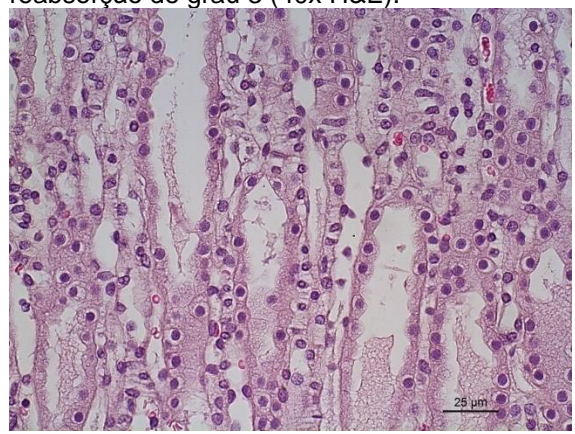
**Figura 114.** Rato W13 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



**Figura 115.** Rato W5 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



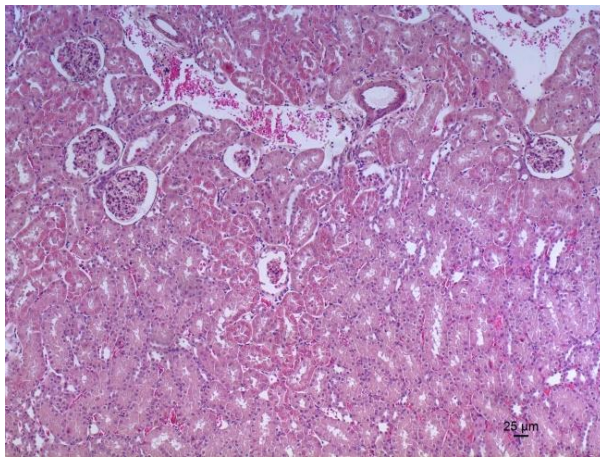
**Figura 116.** Rato W18 (G3B). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (40x H&E).



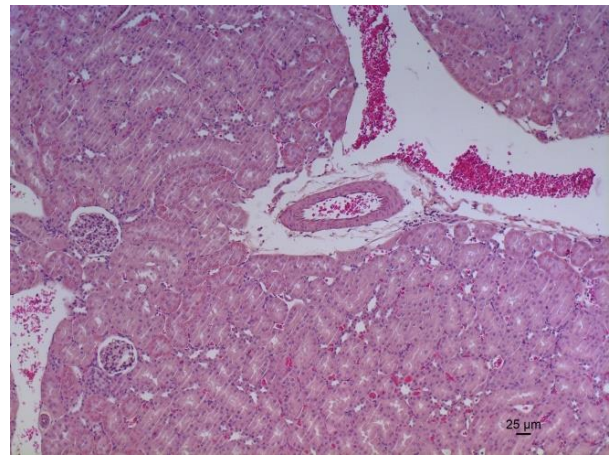
**Figura 117.** Pélvis normal, ductos colectores (40xH&E).



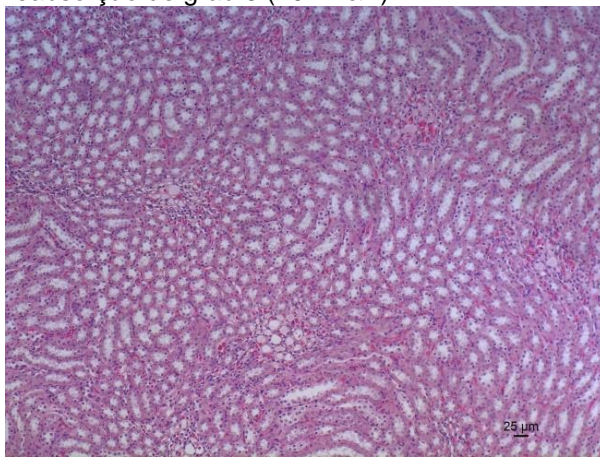
#### 3.2.1.4. GRUPO DE ANIMAIS ANÊMICOS G3C



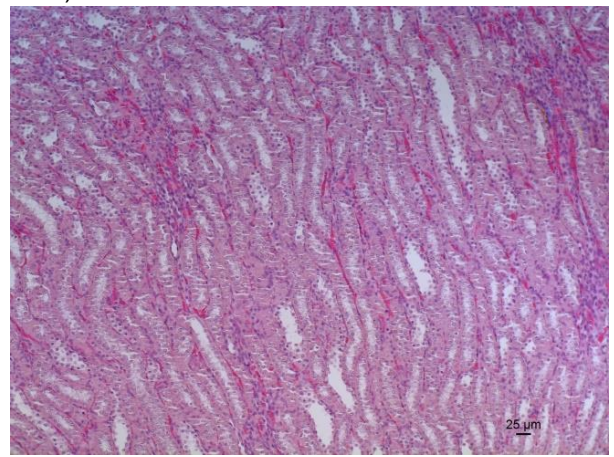
**Figura 118.** Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2, reabsorção de grau 3 (10x H&E).



**Figura 119.** Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2 (10x H&E).



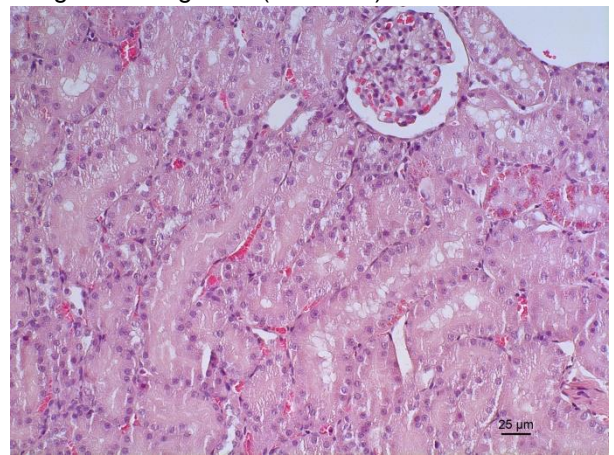
**Figura 120.** Rato W7 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1 (10x H&E).



**Figura 121.** Rato W20 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1 (10x H&E).

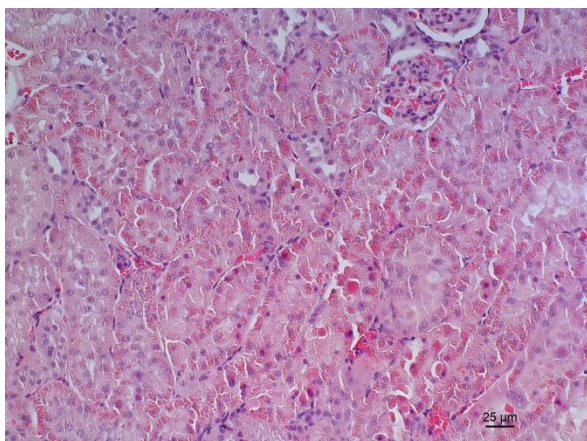


**Figura 122.** Rato W20 (G3C). Pélvis normal (10x H&E).

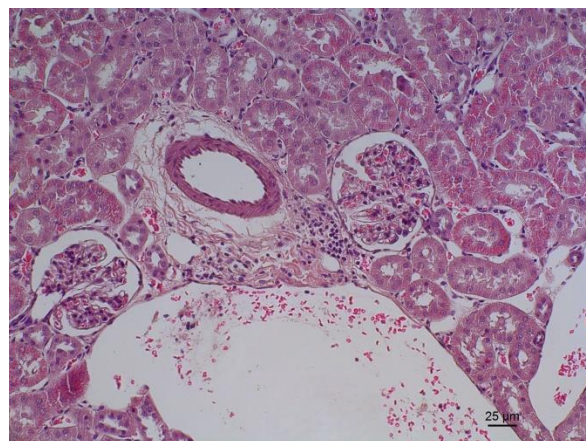


**Figura 123.** Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1 (20x H&E).

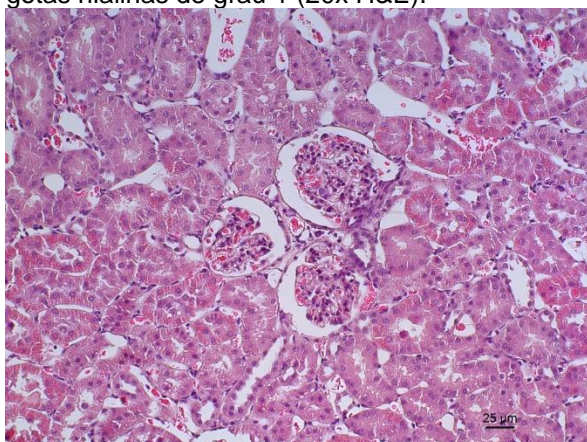




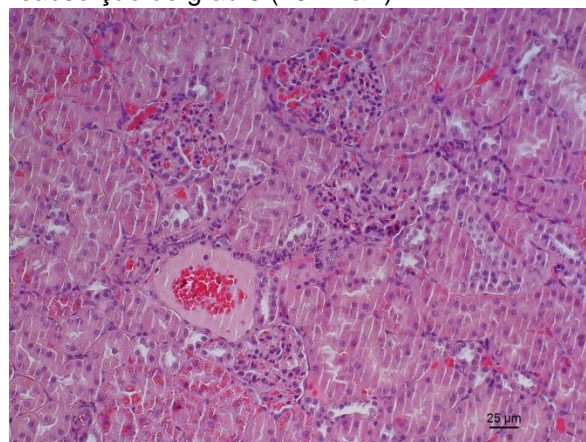
**Figura 124.** Rato W4 (G3C). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3, gotas hialinas de grau 1 (20x H&E).



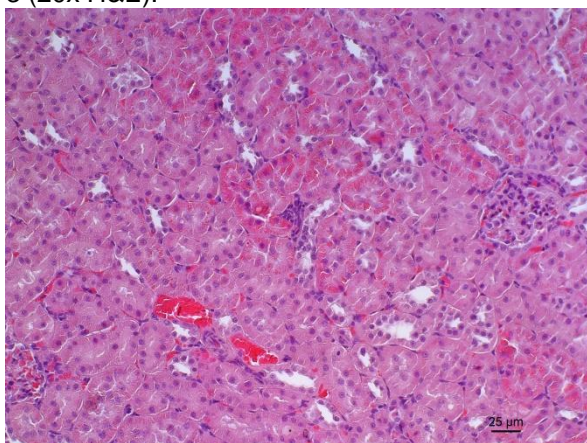
**Figura 125.** Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).



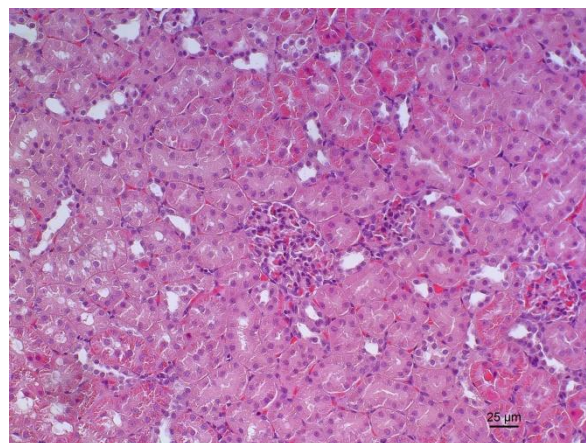
**Figura 126.** Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).



**Figura 127.** Rato W12 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, reabsorção de grau 3 (20x H&E).

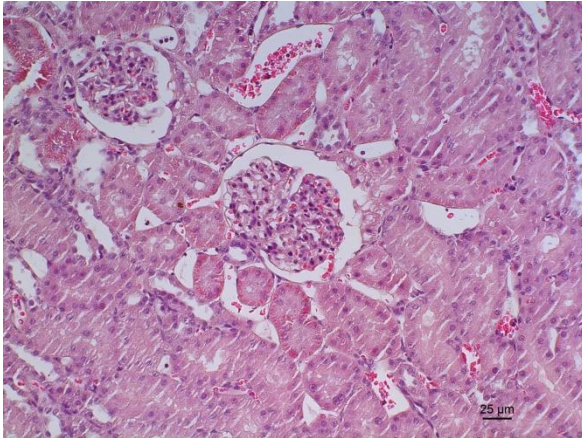


**Figura 128.** Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).

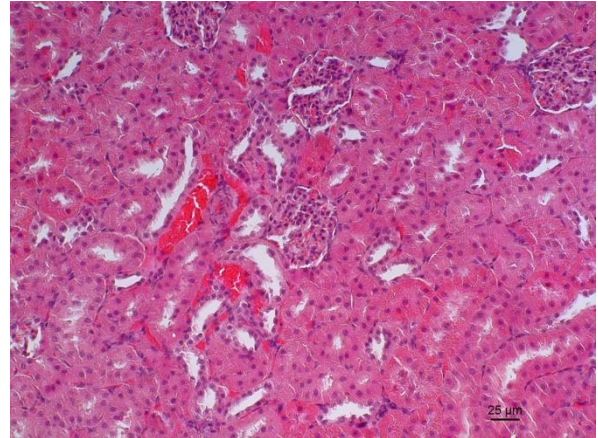


**Figura 129.** Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 (20x H&E).

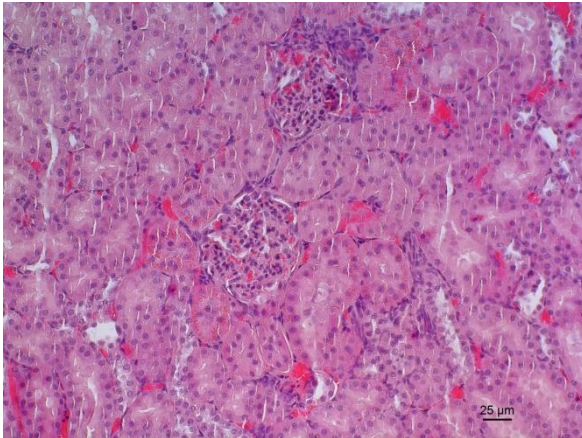




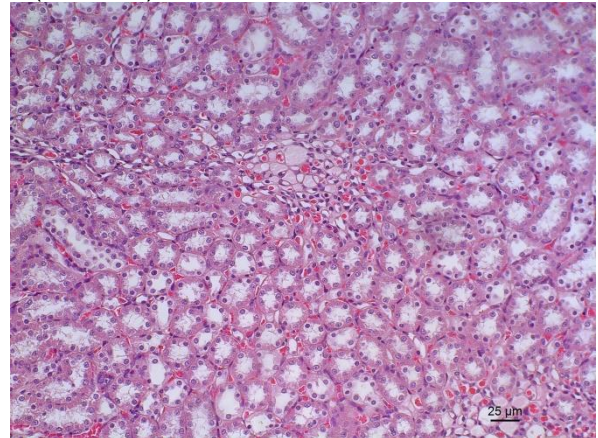
**Figura 130.** Rato W20 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, glomérulo com hipercelularidade de grau 1 (20x H&E).



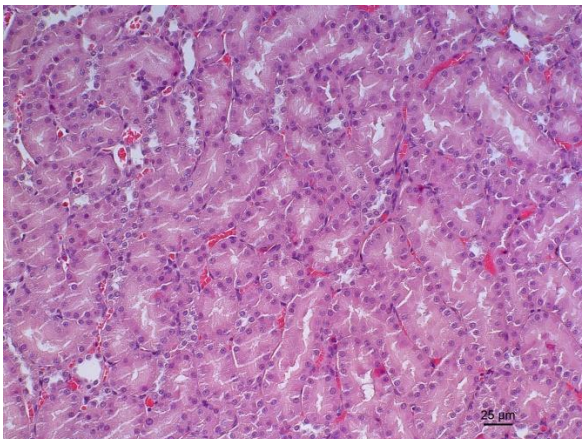
**Figura 131.** Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, glomérulo com hipercelularidade de grau 2, reabsorção de grau 3 (20x H&E).



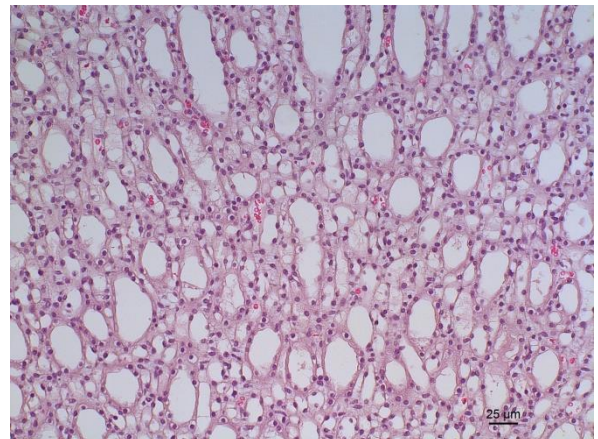
**Figura 132.** Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hipercelularidade de grau 2 (20x H&E).



**Figura 133.** Rato W7 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1 (20x H&E).

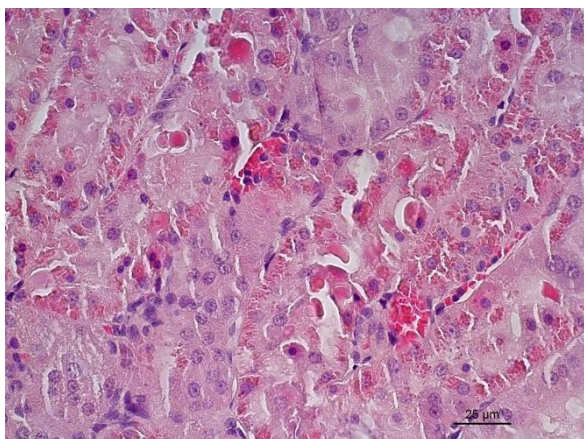


**Figura 134.** Rato W12 (G3C). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2 (20x H&E).

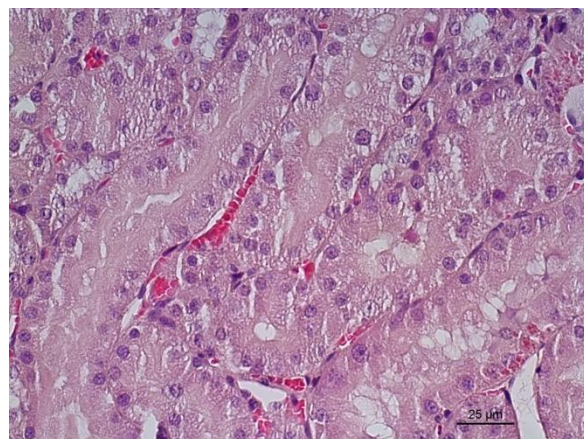


**Figura 135.** Rato W20 (G3C). Pélvis normal (20x H&E).

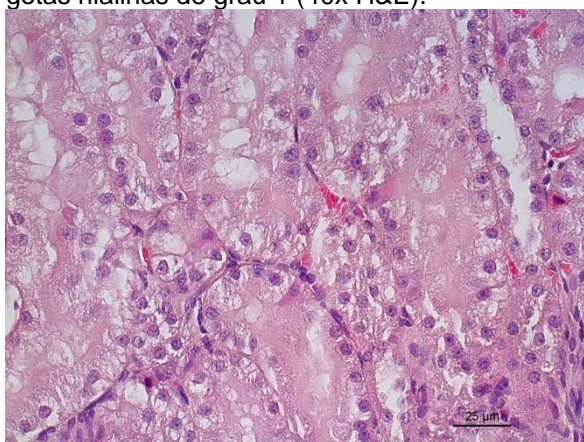




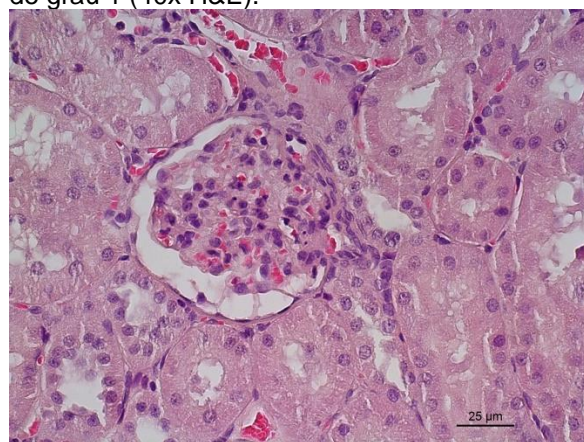
**Figura 136.** Rato W4 (G3C). Congestão de grau 1, inflamação de grau 1, reabsorção d grau 3 e gotas hialinas de grau 1 (40x H&E).



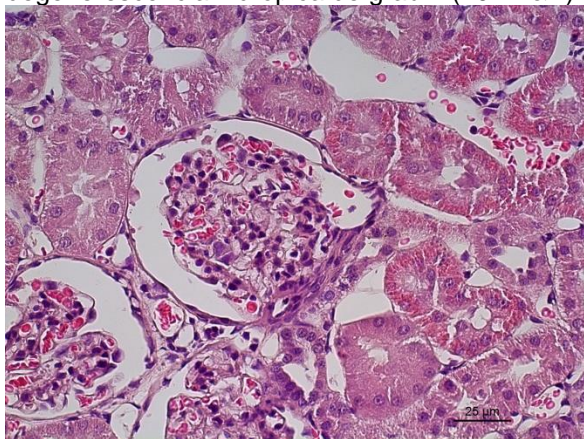
**Figura 137.** Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 (40x H&E).



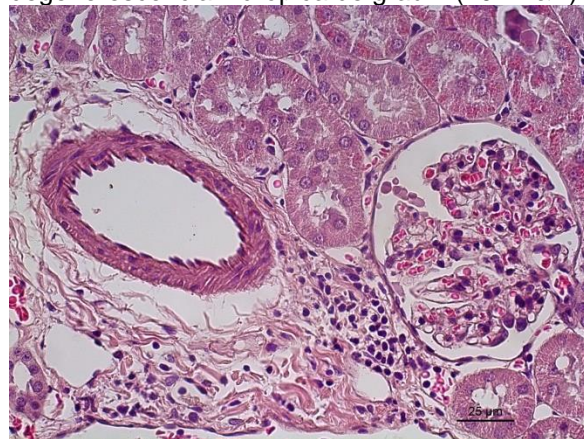
**Figura 138.** Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 (40x H&E).



**Figura 139.** Rato W4 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 (40x H&E).

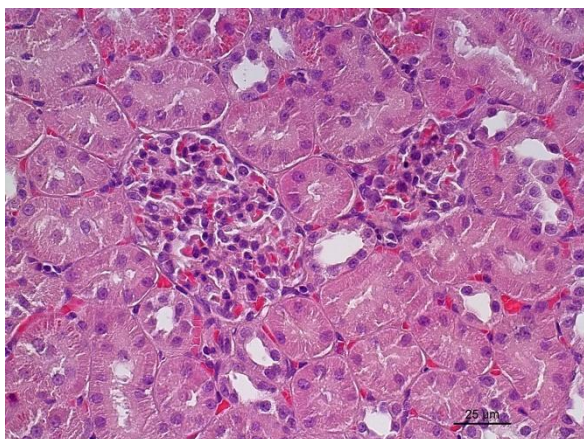


**Figura 140.** Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, glomérulo com hipercelularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

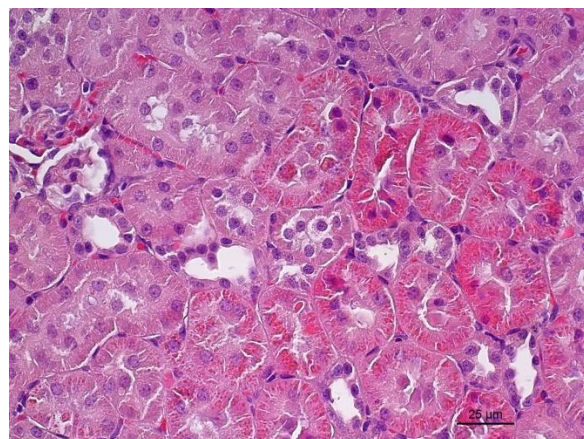


**Figura 141.** Rato W7 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 2, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

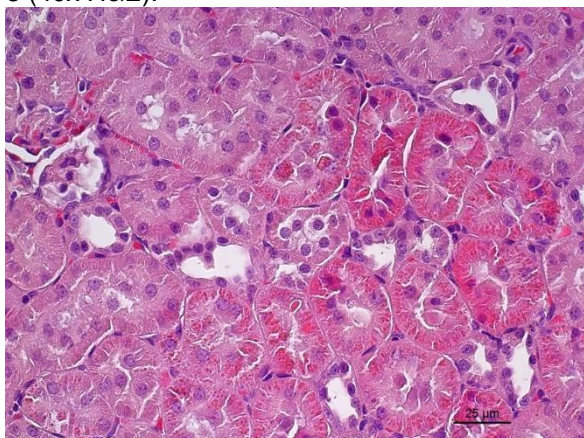




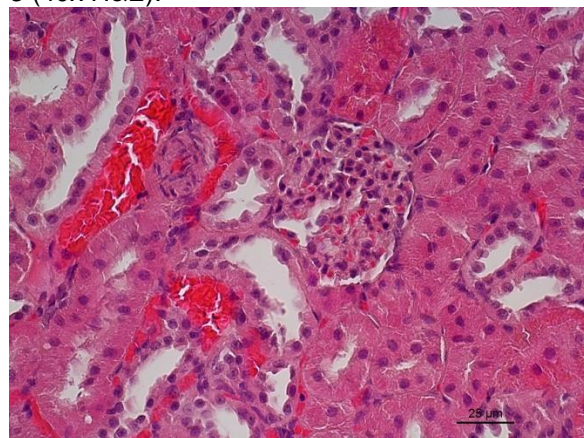
**Figura 142.** Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



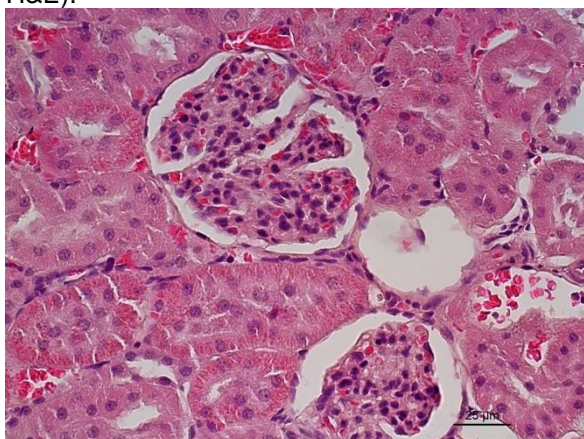
**Figura 143.** Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



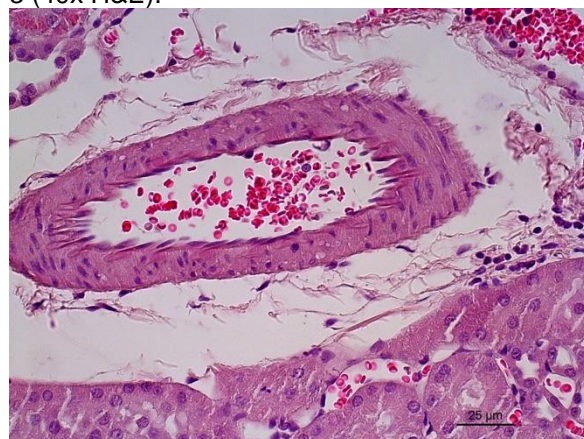
**Figura 144.** Rato W12 (G3C). Congestão de grau 2, inflamação de grau 2, degenerescência hidrópica de grau 1, reabsorção de grau 3 (40x H&E).



**Figura 145.** Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 2, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

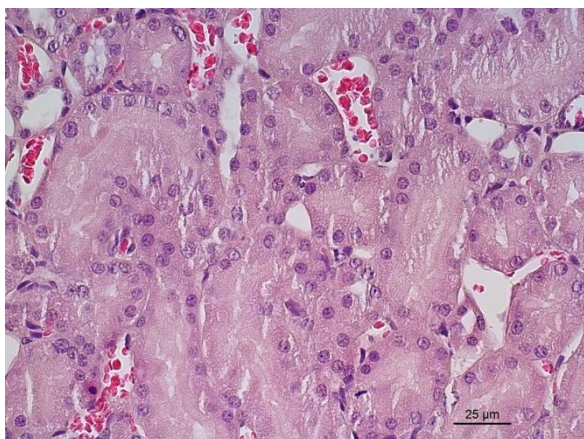


**Figura 146.** Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, glomérulo com hiper celularidade de grau 2, reabsorção de grau 3 (40x H&E).

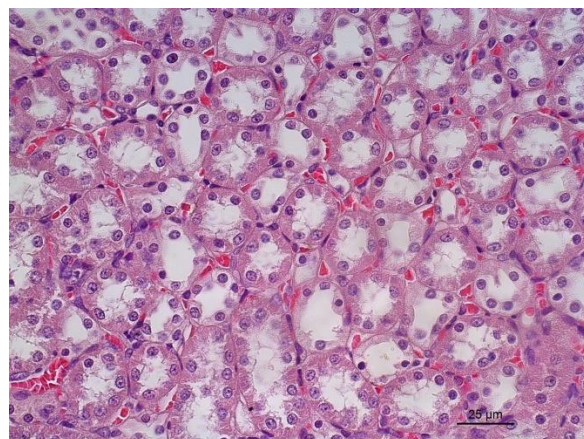


**Figura 147.** Rato W24 (G3C). Cortex normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 1 (40x H&E).

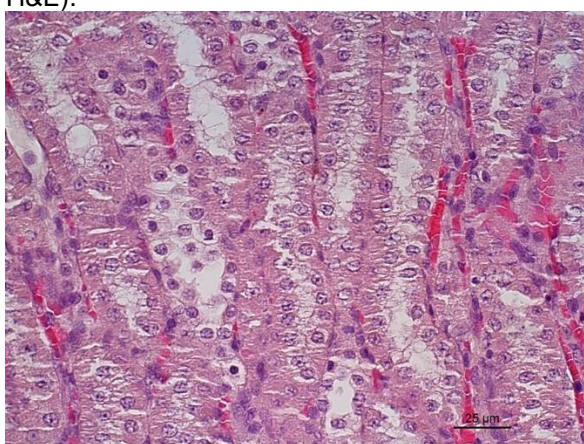




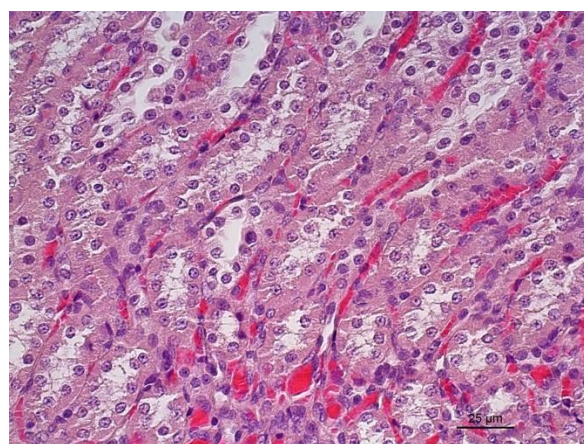
**Figura 148.** Rato W4 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1, inflamação de grau 1 (40x H&E).



**Figura 149.** Rato W7 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1 (40x H&E).



**Figura 150.** Rato W20 (G3C). Medular normal, congestão de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 (40x H&E).



**Figura 151.** Rato W24 (G3C). Medular normal, congestão de grau 2, inflamação de grau 2 (40x H&E).

### 3.4. DISCUSSÃO

A avaliação histopatológica é subjetiva, e facilmente influenciada por vários factores, nomeadamente, o método de recolha, o número de amostras, a forma de fazer as preparações histológicas e acima de tudo, a experiência dos histopatologistas que as observam e avaliam (Rychlik *et al.*, 2012; Evaristo, 2014), por esta razão e para obviar o nível de subjectividade, todas as preparações histológicas do presente estudo, foram avaliadas por dois patologistas independenteendes, seguindo o sistema de classificação histológica de Tervaert e os seus colaboradores criaram em 2006 para classificar a nefropatia diabética.

Relativamente ao grupo de animais controlo, apenas duas das lesões em estudo foram encontradas, nomeadamente a congestão e a presença de cilindros

hemossiderínicos. No grupo de animais controlo não eram esperadas alterações, no entanto, a congestão apresentada pode ser justificada pela anestesia.

Durante a anestesia, há maior risco de hipotensão devido à depressão do Sistema Nervoso Central e ao uso de drogas vasodilatadoras. Ocorre também uma redução da expansão pulmonar e da frequência respiratória oriundas do uso de drogas que promovem depressão cardiorrespiratória, aumentando assim o risco de hipóxia (Baetge & Matthews, 2012; Bragato, 2013).

Nestas condições, os animais podem desenvolver a síndrome cardiorrenal, que estimulada pela hipotensão, gera fatores compensadores como a ativação do Sistema regina-angiotensina-aldosterona levando a uma vasoconstrição e retenção de água e sódio (Cole *et al.*, 2012; Bragato, 2013). Essas alterações reduzem o fluxo sanguíneo renal causando isquemia, retenção de líquidos e redução do débito cardíaco, que por sua vez, causam congestão e edema (Ross, 2009; Bragato, 2013).

A presença de cilindros hemossiderínicos é também justificada pela toxicidade da anestesia. Segundo Alberto *et al.*, 2016, a presença de cilindros intraluminais, neste caso, hemossiderínicos, é comum em animais em contacto com químicos num tempo estimado de 21 horas. Este tempo justifica o facto de os cilindros aparecerem apenas no grupo controlo já com flebotomia.

Em relação ao grupo de animais anémicos, verificou-se, tal como seria de esperar, que quanto maior a anemia que o animal sofreu, maior foi o número de lesões apresentadas.

Relativamente ao G3a, as lesões apresentadas foram congestão, reabsorção tubular de grau 2 e infiltrado inflamatório de grau 1.

Em situações normais a região medular externa vive constantemente à beira da hipóxia, sendo a primeira a ser afetada por um processo de isquemia renal grave. As lesões tubulares precoces, incluindo as lesões de reabsorção, foram já relatadas em pacientes com *Diabetes Mellitus* cuja função glomerular estava ainda intacta, sendo a hipóxia crónica do túbulo-interstício, reconhecida como um mecanismo de progressão comum a muitas doenças renais (Singh *et al.*, 2008).

A presença de infiltrado inflamatório vai de encontro ao descrito na bibliografia, segundo Costa *et al.*, 2014, o infiltrado inflamatório é um dos factores a ser avaliado nas lesões provocadas por hipóxia. A inflamação é a resposta do organismo a qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual (Gerard & Rollins, 2001; Tracey, 2002; Moss *et al.*, 2004), logo, era de esperar que assim que



começasse a aparecer lesões a nível renal, o organismo inicia-se os processos inflamatórios como resposta aquelas agressões.

No que diz respeito ao G3b, as lesões observadas foram a congestão, a reabsorção tubular de grau 3 e o infiltrado inflamatório de grau 1. Todas estas lesões eram expectáveis, pois já haviam sido descritas no grupo de animais anémicos anterior (G3a). A reabsorção tubular neste grupo (G3b), surgiu num grau superior que o anterior (G3a), sendo isto justificado pelo facto do segundo grupo se caracterizar por uma anemia mais grave (com hemoglobina compreendida entre 9,5 e 10,5) e, por isso, o rim estar mais susceptível à hipóxia.

Já relativamente ao grupo G3c, as lesões apresentadas foram a congestão, a hiper celularidade de grau 1 e 2 a nível glomerular, a reabsorção tubular de grau 3, a presença de gotas hialinas tubulares de grau 1, degenerescência hidrópica de grau 1 e infiltrado inflamatório de grau 1 e 2, lesões mais acentuadas que no grupo anterior, motivadas pela hipóxia superior neste grau mais elevado de anemia (hemoglobina a baixo de 9,5).

O infiltrado inflamatório surge aqui com um grau mais elevado, grau 2. Sendo importante salientar que a inflamação crónica e as citocinas podem piorar a anemia, reduzindo a vida útil dos eritrócitos, induzindo a apoptose de precursores eritróides e inibindo diretamente a proliferação de progenitores de eritrócitos (Canavesi *et al.*, 2012; Valenti *et al.*, 2014; Petrulienė *et al.*, 2017), sendo, por isto, uma indicação de prognóstico pior para o paciente.

Neste grupo apareceu também a primeira lesão glomerular, sugerida por Costa *et al.*, 2014, a hiper celularidade indicada como uma das mais importantes lesões a este nível provocada por hipóxia. O aumento da celularidade em algumas glomerulonefrites experimentais é devido, principalmente, ao agregar de leucócitos polimorfonucleares e/ ou monócitos derivados da inflamação (Shigematsu *et al.*, 1973; Ferrario *et al.*, 1985).

A lesão glomerular é acompanhada por uma redução do fluxo sanguíneo glomerular, o que leva a um declínio na perfusão dos capilares peritubulares, agravando a hipóxia e, conseqüentemente, promovendo o surgimento de lesões tubulointersticiais (Kriz & LeHir, 2005; Ribeiro *et al.*, 2016b).

As restantes alterações renais são secundárias ao aparecimento de lesões glomerulares, sendo comum a existência de edema difuso, acompanhado de uma leve difusão de polimorfonucleares neutrófilos ou de células mononucleares. Os

túbulos contêm proteínas e cilindros celulares, incluindo cilindros de células sanguíneas e gotas hialinas (Herrington, 2014), fato este, refletido na presença de gotas hialinas tubulares e degenerescência hidrópica, ainda de grau 1, no grupo G2c, tendo sido também estas lesões sugeridas por Costa *et al.*, 2014.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Do estudo histopatológico efetuado em 24 animais, com níveis crescentes de anemia, verificou-se que a congestão foi a primeira lesão a ser detetada, resultado da hipóxia provocada pela anestesia, seguida da reabsorção tubular e inflamação, e, por fim, das lesões glomerulares, especificamente, hiper celularidade.

Verificou-se que após surgirem as primeiras lesões glomerulares uma série de lesões são desencadeadas pelo agravamento da hipóxia, particularmente, a presença de gotas hialinas tubulares e degenerescência hidrópica.

A caracterização das lesões renais em diferentes níveis de anemia permite que na testagem de fármacos anti-anémicos ou protectores da insuficiência renal sejam verificadas melhorias/decréscimos nas lesões identificadas e caraterizadas no presente estudo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abensur H** (2010). Deficiência de ferro na doença renal crônica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 32(2): 84-88.

**Ali TM, Genina AM, Abo-Salem OM** (2014). The determinants of hepcidin level in chronic kidney disease and hemodialysis Saudi patients. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(2): 133-139.

**Almeida FMT** (2014). Regulação da produção da Eritropoietina e novas abordagens terapêuticas no tratamento da anemia da Doença Renal Crônica. *Tese de Mestrado Integrado em Medicina*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto: 21-31.

**Amadasi A, Gentile G, Rancati A, Zoja R** (2016). Macroscopic and histopathological aspects of chemical damage to human tissues depending on the survival time. *Int J Legal Med*. 130: 743-749.

**Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM** (1985). Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J. Clin. Invest*. 76: 612-619.

**Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, Taube DH, Bloom SR, Tam FWK, Chapman RS, Maxwell PH, Choi P** (2009). Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *International Society of Nephrology - Kidney International*. 75: 976-981.

**Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J** (2002). Association of kidney function with anemia: the third national health and nutrition examination survey (1988-1994). *Arch. Intern. Med*. 162: 1401-1408.

**Atkinson MA, Warady BA** (2017). Anemia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*.

**Baetge CL, Matthews NS** (2012). Anesthesia and analgesia for geriatric veterinary patients. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 42(4): 643-53.

**Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, Kamysz W, Ochocka RJ, Collawn JF, Bartoszewski R** (2015). The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *The FASEB Journal*. 29: 1467-1479.

**Bastos MG** (2006). Anemia and Progression of Chronic Kidney Disease. *J Bras Nefrol*. 28(3): 18-21.

**Bastos MG, Bregman R, Kirsztajn GM** (2010): Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. *Rev Assoc Med Bras.* 56(2): 248-53.

**Bishu K, Agarwal R** (2006). Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety. *Clin J Am Soc Nephrol.* 1 (1):19-23.

**Bosman DR, Winkler AS, Marsden JT, Macdougall IC, Watkins PJ** (2001). Anemia With Erythropoietin Deficiency Occurs Early in Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care.* 24(3): 495-499.

**Bosman DR, Winkler AS, Marsden JT, Macdougall IC, Watkins PJ** (2001). Anemia with erythropoietin deficiency occurs early in diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 24: 495-499.

**Bragato N** (2013). Fisiologia renal e insuficiência renal aguda em pequenos animais: causas e consequências. *Dissertação de mestrado em Ciência Animal.* Universidade Federal de Goiás, Goiânia: 15,23,25,32.

**Brenner BM** (2002). Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J. Clin. Invest.* 110:1753-1758.

**Canavesi E, Alfieri C, Pelusi S, Valenti L** (2012). Hcpidin and HFE protein: iron metabolism as a target for the anemia of chronic kidney disease. *World Journal of Nephrology.* 1: 166-176.

**Cases-Amenós A, Martínez-Castelao A, Fort-Ros J, Bonal-Bastons J, Ruiz MP, Vallés-Prats M, Coll-Piera E, Galcerán-Gui JM; Investigadores del Estudio Micenás I** (2014). Prevalence of anaemia and its clinical management in patients with stages 3-5 chronic kidney disease not on dialysis in Catalonia: MICENAS I study. *Nefrologia.* 34(2): 189-198.

**Cheung WW, Paik KH, Mak RH** (2010). Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 25:711-724.

**Choi D, Kim M, Park J** (1996). Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications.* 687(1): 189-199.

**Chonchol M, Lippi G, Montagnana M, Muggeo M, Targher G** (2008). Association of inflammation with anaemia in patients with chronic kidney disease not requiring chronic dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 23: 2879-2883.

**Cole RT, Masoumi A, Triposkiadis F, Giamouzis G, Georgiopoulou V, Kalogeropoulos A, Butler J** (2012). Renal dysfunction in heart failure. *Medical Clinics of North America.* 96: 955-974.

**Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, van Lente F, Levey AS** (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 298: 2038-2047.

**Costa E, Belo L, Quintanilha, Silva AS** (2009). Resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients – focus on inflammatory cytokines, leukocyte activation, iron status and erythrocyte damage. *Journal of Nephrology and Renal Transplantation*. 2(3): 66-83.

**Costa E, Fernandes J, Ribeiro S, Sereno J, Garrido P, 3, Rocha-Pereira P, Coimbra S, Catarino C, Belo L, Bronze-da-Rocha E, Vala H, Alves R, Reis F, Santos-Silva A** (2014). Aging is Associated with Impaired Renal Function, INF-gamma Induced Inflammation and with Alterations in Iron Regulatory Proteins Gene Expression. *Aging and Disease*. 5(2): 1-10.

**Costa E, Lima M, Alves JM, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A** (2008). Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. *J Clin Immunol*. 28 (3): 268-75.

**Costa E, Pereira BJ, Rocha-Pereira P, Rocha S, Reis F, Castro E, Teixeira F, Miranda V, do Sameiro Faria M, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A** (2008). Role of prohepcidin, inflammatory markers and iron status in resistance to rhEPO therapy in hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol*. 28 (4): 677-683.

**Crivellenti SB** (2014). Fatores indutores e supressores da eritropoiese em caninos doentes renais crônicos. *Tese de Doutorado em Medicina Veterinária*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal: 1-30.

**Do Sameiro-Faria M, Ribeiro S, Rocha-Pereira P, Fernandes J, Reis F, Bronze-da-Rocha E, Miranda V, Quintanilha A, Costa E, Belo L, Santos-Silva A** (2013). Body mass index and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in maintenance hemodialysis patients. *Ren. Fail*. 35: 1392-1398.

**Drueke TB, Eckardt KU** (2002). Role of secondary hyperparathyroidism in erythropoietin resistance of chronic renal failure patients. *Nephrol. Dial. Transplant*. 17: 28-31.

**El Nahas M** (2005). The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 68: 2918-2929.

**Eltzschig HK, Carmeliet P** (2011). Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* 364: 656-665.

**Evaristo VMP** (2014). Doença inflamatória intestinal em cães: ensaio de um modelo de classificação histopatológica. *Mestrado Integrado em Medicina Veterinária*. Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real: 59-65.

**Ezekowitz JA, McAlister FA, Armstrong PW** (2003). Anemia is common in heart failure and is associated with poor outcomes: Insights from a cohort of 12 065 patients with new-onset heart failure. *Circulation*. 107: 223-225.

**Fernandes JC, Garrido P, Ribeiro S, Rocha-Pereira P, Bronze-da-Rocha E, Belo L, Costa E, Reis F, Santos-Silva A** (2014). Iron as the Key Modulator of Hepcidin Expression in Erythroid Antibody-Mediated Hypoplasia. *BioMed Research International*.

**Fernandes NMS, Fernandes N, Magacho EJC, Bastos MG** (2015). Nomograma para a estimativa da taxa de filtração glomerular em indivíduos idosos. *J Bras Nefrol.* 37(3): 379-381.

**Ferrario F, Castiglione A, Colasanti G, Belgiojoso G B, Bertoli S, D'amico G** (1985). The detection of monocytes in human glomerulonephritis. *Kidney international*. 28: 513-519.

**Fishbane S, Nissenson AR** (2010). Anemia management in chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 78(117): 53-59.

**Fontelonga A** (2001). Eritropoetina. *Alert Life Sciences Computing*. <http://www.alert-online.com/pt/medical-guide/eritropoetina>, consultado em 11/09/2017.

**Ganz T** (2007). Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol.* 18(2): 394-400.

**Garrido P, Ribeiro S, Fernandes J, Vala H, Pereira PR, Rocha E B, Belo L, Costa E, Silva A, Reis F** (2016). Resistance to Recombinant Human erythropoietin Therapy in a Rat Model of Chronic Kidney Disease Associated Anemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(1): 28.

**Garrido P, Ribeiro S, Fernandes JC, Vala H, Bronze-da-Rocha E, Rocha-Pereira P, Belo L, Costa E, Santos-Silva A, Reis F** (2015). Iron-hepcidin dysmetabolism, anemia and renal hypoxia, inflammation and fibrosis in the remnant kidney rat model. *PLoS One*. 10(4):e0124048.

**Gerard C, Rollins BJ** (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2: 108-115.

**Gunaratnam L, Bonventre JV** (2009). HIF in kidney disease and development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 1877-1887.

**Gupta N, Wish JB** (2017). Hypoxia – Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potencial New Tratment for Anema in Patients with CKD. *American Journal of Kidney Diseases.* 69(6): 815-826.

**Haase VH** (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 27: 41-53.

**Haase VH** (2015). Inflammation and hypoxia in the kidney: friends or foes? *Kidney Int.* 88: 213-215.

**Herrington CS** (2014). Muir's Textbook of Pathology (15<sup>a</sup> Edição). New York, CRC Press: 402.

**Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S** (2010). Experimental ischemiareperfusion: biases and myths-the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney Int.* 77: 9-16.

**Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH** (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Clin. Investig.* 117(12): 3810-3820.

**Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M** (2017). Renal Hypoxia in CKD; Pathophysiology and Detecting Methods. *Frontiers in Physiology.* 8(99): 1-10.

**Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM** (1981). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am. J. Physiol.* 241:85 -93.

**Hung SC, Lin YP, Tarng DC** (2014). Erythropoiesis-stimulating agents in chronic kidney disease: What have we learned in 25 years?. *J. Formos. Med. Assoc.* 113: 3-10.

**Johnson DW, Pollock CA, Macdougall IC** (2007). Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness. *Nephrology.* 12: 321-330.

**Joss N, Patel R, Paterson K, Simpson K, Perry C, Stirling C** (2007). Anaemia is common and predicts mortality in diabetic nephropathy. *QJM.* 100: 641-647.

**Kalucka J, Schley G, Georgescu A, Klanke B, Rossler S, Baumgartl J, Velden J, Amann K, Willam C, Johnson RS, Eckardt KU, Weidemann A** (2015). Kidney injury is independent of endothelial HIF-1 $\alpha$ . *J. Mol. Med. (Berl.).* 93: 891-904.



**Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Madsen KM, Schreiner GF, Johnson RJ** (2001). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1434-1447.

**Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, Yao B, Zhang MZ, Harris RC, Duffy KJ, Connie L. Erickson-Miller CL, Sutton TA, Haase VH** (2014). Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J. Clin. Investig.* 124: 2396-2409.

**Keane WF, Lyle PA** (2003). Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Receptor Antagonist Losartan study. Recent advances in management of type 2 diabetes and nephropathy: lessons from the RENAAL study. *Am J Kidney Dis.* 41(3):22-25.

**King MW** (2018). The Medical Biochemistry Page. <https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php>, consultado em 07/03/2018.

**Koh MY, Powis G** (2012). Passing the baton: The HIF switch. *Trends Biochem.* 37: 364-372.

**Koury MJ, Haase VH** (2015). Anaemia in kidney disease: Harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat. Rev. Nephrol.* 11: 394-410.

**Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ** (1988). Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood.* 71(2): 524-527.

**Kovesdy CP, Trivedi BK, Zadeh KK, Anderson JE** (2006). Association of anemia with outcomes in men with moderate and severe chronic kidney disease. *International Society of Nephrology.* 69: 560-564.

**Krikorian SA** (2008). Managing Anemia of Chronic Kidney Disease. *American Journal of Lifestyle Medicine.* 3(2).

**Kriz W, LeHir M** (2005). Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models, *Kidney Int.* 67: 404-419.

**Kushida N, Nomura S, Mimura I, Fujita T, Yamamoto S, Nangaku M, Aburatani H** (2016). Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Activates the Transforming Growth Factor- $\beta$ /SMAD3 Pathway in Kidney Tubular Epithelial Cells. *Am. J. Nephrol.* 44: 276-285.

**Langston RD, Presley R, Flanders WD, Mcclellan WM** (2001). Renal insufficiency and anemia are independent risk factors for death among patients with acute myocardial infarction. *Kidney International*. 64: 1398-1405.

**Lankhorst CE, Wish JB** (2010). Anemia in renal disease: Diagnosis and management. *Blood Rev*. 24: 39-47.

**Li H, Satriano J, Thomas JL, Miyamoto S, Sharma K, Pastor-Soler NM, Hallow KR, Singh P** (2015). Interactions between HIF-1 $\alpha$  and AMPK in the regulation of cellular hypoxia adaptation in chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 309: 414-428.

**Liu J, Wei Q, Guo C, Dong G, Liu Y, Tang C, Zheng Dong Z** (2017). Hypoxia, HIF, and Associated Signaling Networks in Chronic Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 18: 950.

**Łukaszyk E, Łukaszyk M, Koc-Żórawska E, Tobolczyk J, Bodzenta-Łukaszyk A, Małyszko J** (2015). Iron Status and Inflammation in Early Stages of Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res*. 40(4): 366-73.

**Luo R, Zhang W, Zhao C, Zhang Y, Wu H, Jin J, Zhang W, Grenz A, Eltzschig HK, Tao L, Kellems RE, Xia Y** (2015). Elevated endothelial hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  contributes to glomerular injury and promotes hypertensive chronic kidney disease. *Hypertension*. 66(1): 75-84.

**Matsumoto M, Tanaka T, Yamamoto T, Noiri E, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M** (2004). Hypoperfusion of peritubular capillaries induces chronic hypoxia before progression of tubulointerstitial injury in a progressive model of rat glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol*. 15: 1574-1581.

**Mcclellan WM, Flanders WD, Langston RD, Jurkovitz C, Presley R** (2002). Anemia and Renal Insufficiency Are Independent Risk Factors for Death among patients with Congestive Heart Failure Admitted to Community Hospitals: A Population-Based Study. *Journal of the American Society of Nephrology*. 13: 1928-1936.

**Means RTJ, Krantz SB** (1991). Inhibition of human erythroid colony-forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin. *Blood*. 78:2564-2567.

**Meguid El, Nahas A, Bello AK** (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*. 365: 331-340.

**Mimura I, Nangaku M** (2010). The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 6: 667-678.

**Moore E, Bellomo R** (2011). Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Annals of Intensive Care.* 1(1): 1-10.

**Moreira ICM** (2010). Anemia em adolescentes, prevalência e factores associados: o papel do *Helicobacter pylori*. *Mestrado em Saúde Pública*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto: 7; 12.

**Moreno F, Sanz-Guajardo D, Lopez-Gomez JM, Jofre R, Valderrabano F** (2000). Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 335-342.

**Moulouel B, Houamel D, Delaby C, Tchernitchko D, Vaulont S, Letteron P, Thibaudeau O, Puy H, Gouya L, Beaumont C, Karim Z** (2013). Hpcidin regulates intrarenal iron handling at the distal néfron. *Kidney International.* 84 (4): 756-766.

**Nangaku M** (2006). Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 17-25.

**Nangaku M, Eckardt KU** (2006). Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol.* 26: 261-268.

**National Kidney Foudnation** (2006). KDOQI-II: Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease in adults. *Am J Kidney Dis.* 47:16-85.

**Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T** (2004). IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Investig.* 113 (9): 1271-1276.

**Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T** (2003). Hpcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood.* 101(7): 2461-2463.

**Ohashi R, Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N** (2002). Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 1795-1805.

**Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, Sciesielski L, Shina A, Heyman SN, Flippin LA, Arend M, Klaus SJ, Bachmann S** (2010). Hypoxia-inducible factor-

2 $\alpha$ -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int.* 77 (4): 312-318.

**Palmer SC, Navaneethan SD, Craig JC, Johnson DW, Tonelli M, Garg AX, Pellegrini F, Ravani P, Jardine M, Perkovic V, Graziano G, McGee R, Nicolucci A, Tognoni G, Strippoli GF** (2010). Meta-analysis: Erythropoiesis-stimulating agents in patients with chronic kidney disease. *Ann. Intern. Med.* 153: 23-33.

**Parfrey PS, Lauve M, Latremouille-Viau D, Lefebvre P** (2009). Erythropoietin therapy and left ventricular mass index in CKD and ESRD patients: A meta-analysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4: 755-762.

**Pecoits-Filho R, Sylvestre LC, Stenvinkel P** (2005). Chronic kidney disease and inflammation in pediatric patients: from bench to playground. *Pediatr Nephrol.* 20: 714-720.

**Petrulienė K, Žiginskienė E, Kuzminskis V, Nedzelskienė I, Bumblytė IA** (2017). Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Medicina.* 53(2): 9-100.

**Post JB, Wilkes BM, Michelis MF** (2006). Iron deficiency in patients with chronic kidney disease: potential role for intravenous iron therapy independent of erythropoietin. *Int Urol Nephrol.* 38: 719-723.

**Preza GC, Pinon R, Ganz T, Nemeth E** (2013). Cellular catabolism of the iron-regulatory peptide hormone hepcidin. *PLoS One.* 8(3): 58934.

**Razvickas CV, Borges FT, Oliveira AS, Schor N, Boim MA** (2013). Efeito da hipóxia e reoxigenação na resposta à angiotensina II em células mesangiais *in vitro*. *J Bras Nefro.* 35 (4):259-264.

**Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A** (2006). Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation.* 116 (2): 288-296.

**Ribeiro S, Belo L, Reis F, Silva AS** (2016a). Iron therapy in chronic kidney disease: Recent changes, benefits and risks. *Blood Reviews.* 30: 65-72.

**Ribeiro S, Garrido P, Fernandes J, Vala H, Rocha-Pereira P, Costa E, Belo L, Reis F, Santos-Silva A** (2016b). Pathological and molecular mechanisms underlying resistance to recombinant human erythropoietin therapy in the remnant

kidney rat model of chronic kidney disease associated anemia. *Biochimie*. 125: 150-62.

**Ribeiro S, Garrido P, Fernandes J, Vala H, Rocha-Pereira P, Costa E, Belo L, Reis F, Santos-Silva A** (2016c). Impaired renal endothelial nitric oxide synthase and reticulocyte production as modulators of hypertension induced by rHuEPO in the rat. *Life Science*.151: 147-56.

**Ribeiro S, Garrido P, Fernandes J, Vala H, Rocha-Pereira P, Costa E, Belo L, Reis F, Santos-Silva A** (2016d). Renal risk-benefit determinants of recombinant human erythropoietin therapy in the remnant kidney rat model – hypertension, anaemia, inflammation and drug dose. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 43: 343-54.

**Romão JEJ, Haiashi AR, Elias RM, Luders C, Ferraboli R, Castro MC** (2006). Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 26(1):59-66.

**Ross S** (2009). Uremia aguda no gato. *Veterinary Focus*. 18: 23-30.

**Rychlik A, Nieradka R, Kander M, Nowicki M, Wdowiak M, Kołodziejska-Sawerska A** (2012). A correlation between the Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index score and the histopathological evaluation of the small intestinal mucosa in canine inflammatory bowel disease. *Pol J Vet Sci*. 15(2): 315-21.

**Semenza GL** (2014). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Ann. Rev. Pathol*. 9: 47-71.

**Shigematsu H, Shishido H, Kuhara K, Tsuchida H, Suzuki H, Hirose K, Tojo S** (1973). Participation of Monocytes in Transient Glomerular Hypercellularity in Poststreptococcal Glomerulonephritis. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath*. 12: 367-370.

**Shimamura T, Morrison AB** (1975). A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am. J. Pathol*. 79:95-106.

**Silva JM** (1985). Mecanismos eritrocitarios de adaptação a hipoxia na insuficiência renal crônica. *Acta Medica Portuguesa*. 6: 190-192

**Singh DK, Winocour P, Farrington K** (2008). Mechanisms of Disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nature Clinical Practice Nephrology*. 1-11.

**Smrzova J, Balla J, Bárány P** (2005). Inflammation and resistance to erythropoiesis-stimulating agents--what do we know and what needs to be clarified?. *Nephrol Dial Transplant*. 20(8):2-7.

**Stenvinkel P** (2001). The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 16: 36-40.

**Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M** (2005). IL-10, IL-6, and TNFalpha: central factors in the altered cytokine network of uremia – the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int*. 67:1216-1233.

**Stevens LA, Li S, Wang C, Huang C, Becker BN, Bombback AS, Brown WW, Burrows NR, Jurkovitz CT, McFarlane SI, Norris KC, Shlipak M, Whaley-Connell AT, Chen SC, Bakris GL, McCullough PA** (2010). Prevalence of CKD and comorbid illness in elderly patients in the United States: Results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Am. J. Kidney Dis*. 55 (3): 23-33.

**Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, Ferrario F, Fogo AB, Haas M, Heer E, Joh Kensuke, Noe LH, Radhakrishnan J, Seshan SV, Bajema IM, Bruijn JÁ** (2010). Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*.

**Thomas MC** (2006) The high prevalence of anemia in diabetes is linked to functional erythropoietin deficiency. *Semin Nephrol*. 26: 275-282.

**Tracey KJ** (2002). The inflammatory reflex. *Nature*. 420: 853-859.

**Tsuchiya K, Nitta K** (2013). Hepcidin is a potential regulator of iron status in chronic kidney disease. *Ther Apher Dial*. 17(1):18.

**Valenti L, Messa P, Pelusi S, Campostrini N, Girelli D** (2014) Hepcidin levels in chronic hemodialysis patients: a critical evaluation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 52: 613-619.

**Vaziri ND** (2008). Anemia and anemia correction: surrogate markers or causes of morbidity in chronic kidney disease?. *Nature Clin Pract Nephrol*. 4: 436-445.

**Vianna HR, Soares CMBM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva ACS** (2011). Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. *J Bras Nefrol*. 33(3): 351-364.

**Vlagopoulos PT, Tighiouart H, Weiner DE, Griffith J, Pettitt D, Salem DN, Levey AS, Mark J. Sarnak MJ** (2005). Anemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality in Diabetes: The Impact of Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 16 (11): 3403-3410.

**Wagner M, Ahsan Alam A, Zimmermann J, Rauh K, Koljaja-Batzner A, Raff U, Wanner C, Schramm L** (2011). Endogenous Erythropoietin and the Association with Inflammation and Mortality in Diabetic Chronic Kidney Disease. *American Society of Nephrology*. 6: 1573-1579.

**Weiss G, Goodnough LT** (2005). Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 352: 1011-1023.

**Weiss G, Goodnough LT** (2005). Anemia of Chronic Disease. *The new england journal of Medicine*. 352: 1011-23.

**Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, ScholzE CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW** (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal*. 17:271-273.

**Wish JB** (2006). Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 1: 4-8.

**Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF** (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 83(1): 59-67.

**Yamaguchi J, Tanaka T, Eto N, Nangaku M** (2015). Inflammation and hypoxia linked to renal injury by CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$ . *Kidney Int*. 88: 262-275.

**Zager RA** (2006). Parenteral iron compounds: potent oxidants but mainstays of anemia management in chronic renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 1(1):24-31.

**Zarychanski R, Houston DS** (2008). Anemia of chronic disease: A harmful disorder or an adaptive, beneficial response?. *Canadian Medical Association Journal*. 179(4): 333-337.

**Zhang QL, Rothenbacher D** (2008). Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: Systematic review. *BMC Public Health*. 8: 117.

**Zhang Y, Thamer M, Stefanik K** (2004). Epoetin requirements predict mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 44: 866-876.